

MECHANISM OF ACTION - Gene therapy; Protein therapy.

USE - The markers are used as a probe or a primer, for diagnosis of conditions such as osteoarthritis, chondrodystrophy, discopathy, cartilage damage, semilunar cartilage disorder, deficient healing of fractures, or in chondrocyte transplants. Screening methods are useful for identifying therapeutic compounds.

ADVANTAGE - The markers detect the activity of genes associated with cartilage, allowing accurate diagnosis, and targeted treatment. Dwg.0/1

=> s jp2003230388/pn

L2 1 JP2003230388/PN

=> d bib abs

L2 ANSWER 1 OF 1 WPIDS COPYRIGHT 2006 THE THOMSON CORP on STN

AN 2003-505295 [47] WPIDS Full-text

DNN N2003-401249 DNC C2003-135132

TI Marker for sugar lipid metabolic disorders for use as probes or primers.

DC B04 D16 S03

IN ICHIHARA, J; SUGARU, E; TAIJI, M

PA (SUMU) SUMITOMO SEIYAKU KK; (SUMU) SUMITOMO PHARM CO LTD

CYC 101

PI WO 2003048359 A1 20030612 (200347)\* JA 87

RW: AT BE BG CH CY CZ DE DK EA EE ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU  
MC MW MZ NL OA PT SD SE SI SK SL SZ TR TZ UG ZM ZW

W: AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CO CR CU CZ DE DK  
DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS KE KG KR KZ LC  
LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO RU  
SC SD SE SG SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW

JP 2003230388 A 20030819 (200363) 36<--

AU 2002361078 A1 20030617 (200419)

ADT WO 2003048359 A1 WO 2002-JP12793 20021205; JP 2003230388 A JP 2002-41542  
20020219; AU 2002361078 A1 AU 2002-361078 20021205

FDT AU 2002361078 A1 Based on WO 2003048359

PRAI JP 2002-41542 20020219; JP 2001-371420 20011205

AN 2003-505295 [47] WPIDS Full-text

AB WO2003048359 A UPAB: 20030723

NOVELTY - Marker for sugar lipid metabolic disorders, is new.

DETAILED DESCRIPTION - Marker for sugar lipid metabolic disorders contain polynucleotides comprising at least 15 bases of the MLTK gene shown in sequences 1-4, comprising 2403, 1368, 3146, and 1429 base pairs fully disclosed in the specification and/or polynucleotides complementary to them. An INDEPENDENT CLAIM is also included for the following:

(1) diagnosing the disorders; and

(2) screening for compounds that control MLTK gene expression.

USE - For use as probes or primers in the detection of sugar lipid metabolic disorders, and treatments and prevention of such disorders by using compounds that control MLTK expression (claimed). Dwg.0/0

=> s jp2003235573/pn

L3 1 JP2003235573/PN

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2003-230388  
(P2003-230388A)

(43) 公開日 平成15年8月19日 (2003.8.19)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ページ数 (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 3/00	4 B 0 2 4
A 6 1 P 3/00		3/10	4 B 0 6 3
3/10		43/00	1 1 1 4 C 0 8 4
43/00	1 1 1	C 0 7 K 16/40	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数20 O L (全 36 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2002-41542(P2002-41542)	(71) 出願人	000183370 住友製薬株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号
(22) 出願日	平成14年2月19日 (2002.2.19)	(72) 発明者	市原 準二 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2001-371420(P2001-371420)	(72) 発明者	須軽 英仁 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内
(32) 優先日	平成13年12月5日 (2001.12.5)	(74) 代理人	100065215 弁理士 三枝 英二 (外8名)
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 糖・脂質代謝異常疾患マーカーおよびその利用

(57) 【要約】

【課題】糖・脂質代謝異常疾患を反映する疾患マーカー、該疾患マーカーを利用した糖・脂質代謝異常疾患の検出方法、該疾患の改善に有用な薬物のスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】MLTK遺伝子の塩基配列中の連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドおよび／または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドを、糖・脂質代謝異常疾患の疾患マーカーとして利用する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号1乃至4のいずれかに示されるMLTK遺伝子の塩基配列中の連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドおよび／または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドである糖・脂質代謝異常疾患の疾患マーカー。

【請求項2】糖・脂質代謝異常疾患の検出においてプローブまたはプライマーとして使用される請求項1に記載の疾患マーカー。

【請求項3】配列番号5乃至8のいずれかに示されるアミノ酸配列よりなるMLTK蛋白質を認識する抗体である糖・脂質代謝異常疾患の疾患マーカー。

【請求項4】糖・脂質代謝異常疾患の検出においてプローブとして使用される請求項3に記載の疾患マーカー。

【請求項5】下記の工程(a)、(b)および(c)を含む糖・脂質代謝異常疾患の検出方法：

(a) 被験者の生体試料から調製されたRNAまたは該RNAから転写された相補的ポリヌクレオチドと請求項1または2に記載の疾患マーカーとを結合させる工程、(b) 該疾患マーカーに結合した生体試料由来のRNAまたは該RNAから転写された相補的ポリヌクレオチドを、上記疾患マーカーを指標として測定する工程、(c) 上記(b)の測定結果に基づいて、糖・脂質代謝異常疾患の罹患を判断する工程。

【請求項6】工程(c)における糖・脂質代謝異常疾患の罹患の判断が、被験者について得られる測定結果を正常者について得られる測定結果と対比して、疾患マーカーへの結合量が増大していることを指標として行われる請求項5に記載の糖・脂質代謝異常疾患の検出方法。

【請求項7】下記の工程(a)、(b)および(c)を含む糖・脂質代謝異常疾患の検出方法：

(a) 被験者の生体試料から調製された蛋白質と請求項3または4に記載の疾患マーカーとを結合させる工程、(b) 該疾患マーカーに結合した生体試料由来の蛋白質またはその部分ペプチドを、上記疾患マーカーを指標として測定する工程、(c) 上記(b)の測定結果に基づいて、糖・脂質代謝異常疾患の罹患を判断する工程。

【請求項8】工程(c)における糖・脂質代謝異常疾患の罹患の判断が、被験者について得られる測定結果を正常者について得られる測定結果と対比して、疾患マーカーへの結合量が増大していることを指標として行われる請求項7に記載の糖・脂質代謝異常疾患の検出方法。

【請求項9】下記の工程(a)、(b)および(c)を含むMLTK遺伝子の発現を抑制する物質のスクリーニング方法：

(a) 被験物質とMLTK遺伝子を発現可能な細胞とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のMLTK遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞の上記遺伝子の発現量と比較する工程、(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、MLTK遺伝子の発現量を減少させる被験物質を選択する工程。

【請求項10】下記の工程(a)、(b)および(c)を含むMLTK蛋白質の発現量を低下させる物質のスクリーニング方法：

(a) 被験物質とMLTK蛋白質を発現可能な細胞または該細胞から調製した細胞画分とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞または細胞画分におけるMLTK蛋白質の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞もしくは細胞画分における上記MLTK蛋白質の発現量と比較する工程、(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、MLTK蛋白質の発現量を低下させる被験物質を選択する工程。

【請求項11】下記の工程(a)、(b)および(c)を含むMLTK蛋白質の機能または活性を抑制する物質のスクリーニング方法：

(a) 被験物質とMLTK蛋白質を含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液、細胞または細胞画分におけるMLTK蛋白質の機能または活性を測定し、該機能または活性を被験物質を接触させない対照水溶液、対照細胞または対照細胞画分における上記MLTK蛋白質の機能または活性と比較する工程、(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、MLTK蛋白質の機能または活性を抑制する被験物質を選択する工程。

【請求項12】下記の工程(a)、(b)および(c)を含むMLTK蛋白質の機能または活性を抑制する物質のスクリーニング方法：

(a) 被験物質の存在下および非存在下でMLTK遺伝子を発現可能な細胞を培養する工程、(b) 被験物質の存在下における細胞培養物中のリン酸化MAPキナーゼ量を測定し、該測定値を被験物質の非存在下における細胞培養液中のリン酸化MAPキナーゼ量と比較する工程、(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、MLTK蛋白質の機能または活性を抑制する被験物質を選択する工程。

【請求項13】MLTK遺伝子を発現可能な細胞が、筋筒細胞、脂肪細胞または心筋細胞である、請求項12に記載のスクリーニング方法。

【請求項14】下記の工程(a)、(b)および(c)を含むMLTK蛋白質の機能または活性を抑制する物質のスクリーニング方法：

(a) MLTK遺伝子を発現可能な細胞にMAPキナーゼにより制御されるレポーター遺伝子を導入し、該細胞を被験物質の存在下および非存在下で培養する工程、(b) 被験物質の存在下で培養した細胞培養物中のレポーター遺伝子発現産物の量を測定し、該量を被験物質の非存在下で培養した細胞培養物中のレポーター遺伝子発現産物の量と比較する工程、(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、MLTK蛋白質の機能または活性を抑制する被験物質を選択する工程。

【請求項15】MLTK遺伝子を発現可能な細胞が、MLTK遺伝子を導入した発現ベクターを保有する哺乳動物細胞であ

る、請求項14に記載のスクリーニング方法。

【請求項16】糖・脂質代謝異常疾患の予防、改善または治療剤の有効成分を探索するための方法である、請求項9乃至15のいずれかに記載のスクリーニング方法。

【請求項17】MLTK遺伝子の発現を抑制する物質を有効成分とする糖・脂質代謝異常疾患の予防、改善または治療剤。

【請求項18】MLTK遺伝子の発現を抑制する物質が請求項9に記載のスクリーニング法により得られるものである請求項17に記載の糖・脂質代謝異常疾患の予防、改善または治療剤。

【請求項19】MLTK蛋白質の発現量、機能または活性を抑制する物質を有効成分とする糖・脂質代謝異常疾患の予防、改善または治療剤。

【請求項20】MLTK蛋白質の発現量、機能または活性を抑制する物質が、請求項10乃至15のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られるものである、請求項19に記載の糖・脂質代謝異常疾患の予防、改善または治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は糖・脂質代謝異常疾患の診断に有用な疾患マーカーに関する。より詳細には、本発明は糖・脂質代謝異常疾患、例えば糖尿病、特に2型糖尿病、高脂血症、肥満症などの疾患の遺伝子診断において、プライマーまたは検出プローブとして有効な疾患マーカーに関する。

【0002】また本発明は、上記疾患マーカーを利用して、糖・脂質代謝異常疾患を検出する方法(診断方法)、糖・脂質代謝異常疾患の予防、改善または治療薬として有効な物質をスクリーニングする方法および該方法によって得られる物質を有効成分とする糖・脂質代謝異常疾患の予防、改善または治療薬に関する。

【0003】

【従来の技術】近年、食生活の西洋化、社会的ストレスの増加などにより、例えば肥満、それに付随する生活習慣病などの糖・脂質代謝異常疾患、特に糖代謝異常疾患の代表例である2型糖尿病に罹患する患者が増加している。

【0004】現在、この2型糖尿病の治療では、まず運動療法および食事療法によって摂食量および体重が管理され、これらの療法によっても体重コントロールなどが不十分な場合は、更に薬物療法が行われている。この薬物療法には、特に血糖値を十分に低下させることができ且つ安全な治療薬が望まれている。

【0005】一方、筋肉および脂肪は、インスリンなどの糖代謝調節因子により制御されており、全身の糖代謝に重要な役割を演じている。特に、ヒトでは、筋肉の全身に対する割合は大きく、従って、筋肉の糖代謝の変化(異常)が血糖値変化に与える影響は非常に大きいと考え

られる。このことは、2型糖尿病患者において筋肉のインスリン抵抗性が観察されることから明らかである。

【0006】このような観点から、筋肉などの臓器は、糖尿病の病態に重大な影響を与える因子のひとつとして着目できる。即ち、筋肉などの臓器におけるインスリン抵抗性の解除、糖代謝の改善などを行うことができる薬剤は、糖尿病の病態改善に大きく貢献すると考えられる。

【0007】しかしながら、このような作用機序をもつ薬剤は、現在のところ上市されておらず、そのような作用機序をもつ薬剤の研究、開発が当業界で望まれている。

【0008】また、最近の医療現場では、糖・脂質代謝異常疾患に限らず、個々の患者の症状に合わせて治療法を的確に選択することが望まれるようになってきている。高齢化社会でのQOL(Quality of life)向上の必要性が認識されてきた近年では、特に、万人に共通した治療ではなく、個々の患者の症状に合わせた適切な治療が強く求められている。このような所謂テーラーメイド治療を行うためには、個々の疾患について患者の症状やその原因(遺伝的背景)を的確に反映する疾患マーカーが有用であり、その探索並びに開発を目指した研究が精力的に行われているのが現状である。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、糖尿病などの糖・脂質代謝異常疾患を反映し、それ故、この疾患の診断および治療に有用な疾患マーカーを提供することを目的とする。また、本発明は該疾患マーカーを利用した糖・脂質代謝異常疾患の検出方法(遺伝子診断方法)、該疾患の予防、改善または治療に有用な薬物をスクリーニングする方法、並びに該疾患の予防、改善または治療に有用な薬物を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上述したように筋肉などの臓器と糖尿病などの糖・脂質代謝異常疾患との関連に着目し、この関連性について鋭意研究を行う過程において、正常状態の筋肉に比して、糖尿病状態の筋肉において、その発現が有意に上昇する因子を同定した。本発明者は、この因子がシグナル伝達因子MAPキナーゼキナーゼキナーゼ(MAPKKK)のひとつであるMLTK(MLK-like mitogen-activated protein triple kinase)蛋白質をコードする遺伝子(J. Biol. Chem., Vol. 276, No. 6, pp. 4276-4286 (Feb. 9, 2001)など参照)であることを見出した。更に、本発明者は、正常マウスと比較して、高脂肪食負荷モデルおよび肥満糖尿病モデル(db/dbマウス、KKAYマウスなど)において、上記MLTK遺伝子の発現が有意に上昇することを認めると共に、糖尿病治療薬の投与によって病態が改善されると、上記MLTK遺伝子の発現量が低下(正常化)することも確認した。

【0011】これらのことから、本発明者は、上記MLTK

遺伝子が、糖尿病をはじめとする糖・脂質代謝異常疾患の疾患マーカーとなり得ることを確認し、この知見を基礎として本発明を完成するに至った。

【0012】本発明の要旨は、下記(1)-(20)の点にある。

【0013】項1. 配列番号1乃至4のいずれかに示されるMLTK遺伝子の塩基配列中の連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドおよび／または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドである糖・脂質代謝異常疾患の疾患マーカー。

【0014】項2. 糖・脂質代謝異常疾患の検出においてプローブまたはプライマーとして使用される項1に記載の疾患マーカー。

【0015】項3. 配列番号5乃至8のいずれかに示されるアミノ酸配列よりなるMLTK蛋白質を認識する抗体である糖・脂質代謝異常疾患の疾患マーカー。

【0016】項4. 糖・脂質代謝異常疾患の検出においてプローブとして使用される項3に記載の疾患マーカー。

【0017】項5. 下記の工程(a)、(b)および(c)を含む糖・脂質代謝異常疾患の検出方法：

(a) 被験者の生体試料から調製されたRNAまたは該RNAから転写された相補的ポリヌクレオチドと項1または2に記載の疾患マーカーとを結合させる工程、(b) 該疾患マーカーに結合した生体試料由来のRNAまたは該RNAから転写された相補的ポリヌクレオチドを、上記疾患マーカーを指標として測定する工程、(c) 上記(b)の測定結果に基づいて、糖・脂質代謝異常疾患の罹患を判断する工程。

【0018】項6. 工程(c)における糖・脂質代謝異常疾患の罹患の判断が、被験者について得られる測定結果を正常者について得られる測定結果と対比して、疾患マーカーへの結合量が増大していることを指標として行われる項5に記載の糖・脂質代謝異常疾患の検出方法。

【0019】項7. 下記の工程(a)、(b)および(c)を含む糖・脂質代謝異常疾患の検出方法：

(a) 被験者の生体試料から調製された蛋白質と項3または4に記載の疾患マーカーとを結合させる工程、(b) 該疾患マーカーに結合した生体試料由来の蛋白質またはその部分ペプチドを、上記疾患マーカーを指標として測定する工程、(c) 上記(b)の測定結果に基づいて、糖・脂質代謝異常疾患の罹患を判断する工程。

【0020】項8. 工程(c)における糖・脂質代謝異常疾患の罹患の判断が、被験者について得られる測定結果を正常者について得られる測定結果と対比して、疾患マーカーへの結合量が増大していることを指標として行われる項7に記載の糖・脂質代謝異常疾患の検出方法。

【0021】項9. 下記の工程(a)、(b)および(c)を含むMLTK遺伝子の発現を抑制する物質のスクリーニング方法：

(a) 被験物質とMLTK遺伝子を発現可能な細胞とを接触さ

せる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のMLTK遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞の上記遺伝子の発現量と比較する工程、(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、MLTK遺伝子の発現量を減少させる被験物質を選択する工程。

【0022】項10. 下記の工程(a)、(b)および(c)を含むMLTK蛋白質の発現量を低下させる物質のスクリーニング方法：

(a) 被験物質とMLTK蛋白質を発現可能な細胞または該細胞から調製した細胞画分とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞または細胞画分におけるMLTK蛋白質の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞もしくは細胞画分における上記MLTK蛋白質の発現量と比較する工程、(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、MLTK蛋白質の発現量を低下させる被験物質を選択する工程。

【0023】項11. 下記の工程(a)、(b)および(c)を含むMLTK蛋白質の機能または活性を抑制する物質のスクリーニング方法：

(a) 被験物質とMLTK蛋白質を含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液、細胞または細胞画分におけるMLTK蛋白質の機能または活性を測定し、該機能または活性を被験物質を接触させない対照水溶液、対照細胞または対照細胞画分における上記MLTK蛋白質の機能または活性と比較する工程、(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、MLTK蛋白質の機能または活性を抑制する被験物質を選択する工程。

【0024】項12. 下記の工程(a)、(b)および(c)を含むMLTK蛋白質の機能または活性を抑制する物質のスクリーニング方法：

(a) 被験物質の存在下および非存在下でMLTK遺伝子を発現可能な細胞を培養する工程、(b) 被験物質の存在下における細胞培養物中のリン酸化MAPキナーゼ量を測定し、該測定値を被験物質の非存在下における細胞培養液中のリン酸化MAPキナーゼ量と比較する工程、(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、MLTK蛋白質の機能または活性を抑制する被験物質を選択する工程。

【0025】項13. MLTK遺伝子を発現可能な細胞が、筋細胞、脂肪細胞または心筋細胞である項12に記載のスクリーニング方法。

【0026】項14. 下記の工程(a)、(b)および(c)を含むMLTK蛋白質の機能または活性を抑制する物質のスクリーニング方法：

(a) MLTK遺伝子を発現可能な細胞にMAPキナーゼにより制御されるレポーター遺伝子を導入し、該細胞を被験物質の存在下および非存在下で培養する工程、(b) 被験物質の存在下で培養した細胞培養物中のレポーター遺伝子発現産物の量を測定し、該量を被験物質の非存在下で培養した細胞培養物中のレポーター遺伝子発現産物の量と比

較する工程、(c)上記(b)の比較結果に基づいて、MLTK蛋白質の機能または活性を抑制する被験物質を選択する工程。

【0027】項15. MLTK遺伝子を発現可能な細胞が、MLTK遺伝子を導入した発現ベクターを保有する哺乳動物細胞である項14に記載のスクリーニング方法。

【0028】項16. 糖・脂質代謝異常疾患の予防、改善または治療剤の有効成分を探索するための方法である、項9乃至15のいずれかに記載のスクリーニング方法。

【0029】項17. MLTK遺伝子の発現を抑制する物質を有効成分とする糖・脂質代謝異常疾患の予防、改善または治療剤。

【0030】項18. MLTK遺伝子の発現を抑制する物質が項9に記載のスクリーニング法により得られるものである項17に記載の糖・脂質代謝異常疾患の予防、改善または治療剤。

【0031】項19. MLTK蛋白質の発現量、機能または活性を抑制する物質を有効成分とする糖・脂質代謝異常疾患の予防、改善または治療剤。

【0032】項20. MLTK蛋白質の発現量、機能または活性を抑制する物質が、項10乃至15のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られるものである、項19に記載の糖・脂質代謝異常疾患の予防、改善または治療剤。

【0033】上記のように、本発明によれば、糖・脂質代謝異常疾患の疾患マーカー、該疾患の検出系、MLTK遺伝子の発現を抑制する物質およびMLTKの発現量、機能もしくは活性を抑制する物質のスクリーニング系、およびこれらの物質を有効成分とする糖・脂質代謝異常疾患の予防、改善および治療剤が提供される。

【0034】前述したように、MLTK遺伝子は、正常状態の筋肉に比して、糖・脂質代謝異常疾患の筋肉において特異的にその発現が上昇し、しかもその発現は糖・脂質代謝異常疾患治療剤の投与による病態の改善に伴って低下（正常化）することから、これらの遺伝子およびその発現産物〔蛋白質、(ポリ)(オリゴ)ペプチド〕は、糖・脂質代謝異常疾患の解明、診断などに有効に利用することができ、この利用によって医学並びに臨床学上、有用な情報、手段などを得ることができる。即ち、個体または組織における、上記遺伝子の発現またはその発現産物の検出、または該遺伝子の変異またはその発現不全の検出は、糖・脂質代謝異常疾患の解明、診断などに有効に利用することができる。

【0035】また、これらの遺伝子およびその発現産物並びにそれらからの派生物(例えば、遺伝子断片、抗体など)は、MLTK遺伝子の発現を抑制する物質およびMLTKの発現量、機能もしくは活性を抑制する物質のスクリーニングに有用であり、該スクリーニングによって得られる物質は、糖・脂質代謝異常疾患の予防、改善および治療薬として有効である。更に、MLTK遺伝子のアンチセンス核酸(アンチセンスヌクレオチド)は、糖・脂質代謝異

常疾患の予防、改善および治療薬として有用である。

【0036】尚、MLTKは、前記文献に報告されているように、核内転写因子の活性化を伴う細胞シグナル伝達系で働いており、細胞生存(細胞の増殖、分化などの生物活性の発現)に必須の役割を果たし、また、サイトカイン、物理学的ストレスなどの刺激により活性化され、cell cycle arrest、アポトーシスなどの誘導に寄与することが知られている。しかるに、該MLTKが糖・脂質代謝と関連することについては、今まで何ら判っておらず、かかる関連を示唆する報文も皆無である。

【0037】

【発明の実施の形態】以下、本明細書において、アミノ酸、(ポリ)ペプチド、(ポリ)ヌクレオチドなどの略号による表示は、IUPAC-IUBの規定〔IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)〕、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(日本国特許庁編)および当該分野における慣用記号に従う。

【0038】本明細書において「遺伝子」または「DNA」とは、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖という各1本鎖DNAを包含する趣旨で用いられる。またその長さによって特に制限されるものではない。従って、本明細書において遺伝子(DNA)とは、特に言及しない限り、ヒトゲノムDNAを含む2本鎖DNAおよびcDNAを含む1本鎖DNA(正鎖)並びに該正鎖と相補的な配列を有する1本鎖DNA(相補鎖)、およびこれらの断片のいずれもが含まれる。

【0039】また当該「遺伝子」または「DNA」には、特定の塩基配列で示される「遺伝子」または「DNA」だけでなく、これらによりコードされる蛋白質と生物学的機能が同等であることを限度として、その同族体(ホモログ)、誘導体および変異体をコードする「遺伝子」または「DNA」が包含される。これら同族体(ホモログ)、誘導体および変異体をコードする「遺伝子」または「DNA」とは、具体的には、後述の(1-1)項に記載のストリンジントな条件下で、前記特定塩基配列で示される「遺伝子」または「DNA」とハイブリダイズするものが挙げられる。また、前記同族体(ホモログ)をコードする遺伝子、例えばヒト遺伝子に対応するマウスやラットなどの他生物種の遺伝子は、HomoloGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/>) により同定することができる。具体的には、特定ヒト塩基配列をBLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90: 5873-5877, 1993, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) にかけて一致する(Scoreが最も高く、E-valueが0でかつIdentityが100%を示す)配列のアクセッション番号を取得し、そのアクセッション番号をHomoloGeneに入力して得られた他生物種遺伝子とヒト遺伝子との遺伝子ホモログの相関を示したリストから、選抜することができる。

【0040】なお、上記遺伝子またはDNAは機能領域の



別を問うものではなく、例えば発現制御領域、コード領域、エキソンまたはイントロンを含むことができる。

【0041】本明細書において「ポリヌクレオチド」とは、RNAおよびDNAのいずれをも包含する趣旨で用いられる。なお、上記DNAには、cDNA、ゲノムDNAおよび合成DNAのいずれもが含まれる。また上記RNAには、total RNA、mRNA、rRNAおよび合成のRNAのいずれもが含まれる。

【0042】本明細書において「蛋白質」または「(ポリ)ペプチド」には、特定の塩基配列で示される「蛋白質」または「(ポリ)ペプチド」だけでなく、これらと生物学的機能が同等であることを限度として、その断片、同族体(ホモログ)、誘導体および変異体が包含される。なお、上記変異体には、天然に存在するアレル変異体、天然に存在しない変異体および人為的に欠失、置換、付加および挿入されることによって改変されたアミノ酸配列を有する変異体が包含される。なお、上記変異体としては、変異のない蛋白質または(ポリ)ペプチドと、少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは95%、さらにより好ましくは97%相同なものを挙げることができる。

【0043】本明細書でいう「抗体」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、およびFabフラグメント、Fab発現ライブラリーなどによって生成されるフラグメントのような抗原結合性を有する上記抗体の一部が包含される。

【0044】さらに本明細書において「疾患マーカー」とは、糖・脂質代謝異常疾患の罹患の有無もしくは罹患の程度を診断するために、また糖・脂質代謝異常疾患の予防、改善または治療に有用な候補物質をスクリーニングするために、直接または間接的に利用されるものをいう。これには、糖・脂質代謝異常疾患の罹患に関連して生体内での発現が変動する遺伝子または蛋白質を特異的に認識するか、またはこれらと結合することのできる、(ポリ)(オリゴ)ヌクレオチドまたは抗体が包含される。これらの(ポリ)(オリゴ)ヌクレオチドおよび抗体は、上記性質に基づいて、生体内、組織や細胞内などで発現した上記遺伝子および蛋白質を検出するためのプローブとして、また(オリゴ)ヌクレオチドは生体内で発現した上記遺伝子を増幅するためのプライマーとして有効に利用することができる。

【0045】以下、MLTK遺伝子(ポリヌクレオチド)並びにこれらの発現産物およびそれらの派生物について、具体的な用途を説明する。

【0046】(1)糖・脂質代謝異常疾患の疾患マーカーおよびその応用

(1-1) ポリヌクレオチド

配列番号1乃至4に示されるポリヌクレオチドは、それぞれヒト由来MLTK $\alpha$ 遺伝子、ヒト由来MLTK $\beta$ 遺伝子、マウス由来MLTK $\alpha$ 遺伝子およびマウス由来MLTK $\beta$ 遺伝子としていずれも公知の遺伝子であり、それら取得方法も、文

献に記載されている(例えば、J. Biol. Chem., Vol. 276, No.6, pp.4276-4286 (Feb. 9, 2001)など参照)。

【0047】本発明は、前述するように、糖・脂質代謝異常疾患に罹患した患者の組織においては、正常な組織に比して、MLTK遺伝子の発現量が特異的に増大しており、また該疾患治療薬の投与によって病態が改善されるとその発現量が低下する(正常化する)という知見を発端に、MLTK遺伝子の発現の有無や発現の程度を検出することによって、上記糖・脂質代謝異常疾患の罹患の有無、罹患の程度、回復の程度などが特異的に検出でき、該疾患の診断を正確に行うことができるという発想に基づくものである。

【0048】上記ポリヌクレオチドは、従って、被験者における上記遺伝子の発現の有無またはその程度を検出することによって、該被験者が糖・脂質代謝異常疾患に罹患しているか否かまたはその疾患の程度を診断することのできるツール(疾患マーカー)として有用である。

【0049】また、上記ポリヌクレオチドは、後述の(3-1)項に記載するような糖・脂質代謝異常疾患の予防、改善または治療に有用な候補物質のスクリーニングにおいて、MLTK遺伝子の発現変動を検出するためのスクリーニングツール(疾患マーカー)としても有用である。

【0050】本発明疾患マーカーは、配列番号1乃至4のいずれかに記載のMLTK遺伝子の塩基配列中の連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドおよび/または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドであることを特徴とする。

【0051】ここで相補的なポリヌクレオチド(相補鎖、逆鎖)とは、配列番号1-4に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドの全長配列または該塩基配列において少なくとも連続した15塩基長の塩基配列を有するその部分配列(ここでは便宜上、これらを「正鎖」ともいう)に対して、A:TおよびG:Cといった塩基対関係に基づき、塩基的に相補的な関係にあるポリヌクレオチドを意味する。かかる相補鎖は、対象とする正鎖の塩基配列と完全に相補配列を形成する場合に限らず、対象とする正鎖とストリンジェントな条件でハイブリダイズすることのできる程度の相補関係を有するものであってもよい。なお、ここでストリンジェントな条件は、Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA) に示されるように、複合体或いはプローブと結合する核酸の融解温度( $T_m$ )に基づいて決定することができる。例えば、ハイブリダイズ後の洗浄条件として、通常「1×SSC、0.1%SDS、37℃」程度の条件を挙げることができる。相補鎖はかかる条件で洗浄しても対象とする正鎖とハイブリダイズ状態を維持するものであることが好ましい。特に制限されないが、より厳しいハイブリダイズ条件としては「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」程度、さらに厳しいハイブリダイズ条件としては「0.1

×SSC、0.1%SDS、65℃」程度の洗浄条件を挙げることができる。具体的には、このような相補鎖として、対象の正鎖の塩基配列と完全に相補的な関係にある塩基配列からなる鎖並びに該鎖と少なくとも90%、好ましくは95%の相同性を有する塩基配列からなる鎖を例示することができる。

【0052】また、正鎖側のポリヌクレオチドには、配列番号1-4のいずれかに示されるMLTK遺伝子の塩基配列またはその部分配列を有するものだけでなく、上記相補鎖の塩基配列に対してさらに相補的な関係にある塩基配列からなる鎖を含めることができる。

【0053】上記正鎖のポリヌクレオチドおよび相補鎖(逆鎖)のポリヌクレオチドは、各々一本鎖の形態で疾患マーカーとして使用されても、また二本鎖の形態で疾患マーカーとして使用されてもよい。

【0054】本発明の糖・脂質代謝異常疾患の疾患マーカーは、具体的にはMLTK遺伝子の配列番号に関する配列番号1-4のいずれかに記載される各塩基配列(全長配列)からなるポリヌクレオチドであってもよいし、その相補配列からなるポリヌクレオチドであってもよい。また、配列番号1-4のいずれかで示されるMLTK遺伝子もしくは該遺伝子に由来するポリヌクレオチドを選択的に(特異的に)認識するものであれば、上記全長配列もしくはその相補配列の部分配列からなるポリヌクレオチドであってもよい。この場合、部分配列としては、上記全長配列もしくはその相補配列の塩基配列から任意に選択される少なくとも15個の連続した塩基長を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0055】ここで「選択的に(特異的に)認識する」とは、例えばノーザンブロット法においては、MLTK遺伝子またはこれに由来するポリヌクレオチドが特異的に検出できること、またRT-PCR法においては、MLTK遺伝子またはこれに由来するポリヌクレオチドが特異的に生成されることを意味するが、それらに限定されず、当業者が上記検出物または生成物がこれらの遺伝子に由来するものであると判断できるものであればよい。

【0056】本発明疾患マーカーは、配列番号1-4に示されるMLTK遺伝子の塩基配列をもとに、例えばprimer 3 (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>)あるいはベクターNTI(Infomax社製)を利用して設計することができる。具体的には配列番号1-4のいずれかに示される塩基配列をprimer 3またはベクターNTIのソフトウェアにかけて得られる、プライマーまたはプローブの候補配列もしくは少なくとも該配列の一部を含む配列をプライマーまたはプローブとして使用することができる。

【0057】本発明疾患マーカーは、上述するように連続する少なくとも15塩基の長さを有するものであればよく、具体的には該疾患マーカーの用途に応じて、その長さを適宜選択し設定することができる。

【0058】(1-2)プローブまたはプライマーとしてのポリヌクレオチド

本発明において糖・脂質代謝異常疾患の検出(診断)は、被験者の生体組織、特に筋肉組織などにおけるMLTK遺伝子の発現の有無または発現レベル(発現量)を評価することによって行われる。

【0059】この検出において、本発明疾患マーカーは、上記遺伝子の発現によって生じたRNAまたはそれに由来するポリヌクレオチドを特異的に認識し増幅するためのプライマーとして、または該RNAまたはそれに由来するポリヌクレオチドを特異的に検出するためのプローブとして利用することができる。

【0060】糖・脂質代謝異常疾患の検出(遺伝子診断)においてプライマーとして用いられる本発明疾患マーカーは、通常15bp-100bp、好ましくは15bp-50bp、より好ましくは15bp-35bpの塩基長を有する。また検出プローブとして用いられる本発明疾患マーカーは、通常15bp-全配列の塩基数、好ましくは15bp-1kb、より好ましくは100bp-1kbの塩基長を有する。

【0061】本発明疾患マーカーは、ノーザンブロット法、RT-PCR法、in situハイブリダーゼーション法などの、特定遺伝子を選択的に検出する公知の方法において、常法に従ってプライマーまたはプローブとして利用することができる。該利用によって糖・脂質代謝異常疾患におけるMLTK遺伝子の発現の有無または発現レベル(発現量)を評価することができる。

【0062】測定対象とする試料は、使用する検出法の種類に応じて適宜選択することができる。該試料は、例えば、被験者の筋肉組織の一部をバイオプシなどで採取し、そこから常法に従って調製したtotal RNAであってもよいし、該RNAをもとにして調製される各種のポリヌクレオチドであってもよい。

【0063】また、生体組織におけるMLTK遺伝子の遺伝子発現レベルは、DNAチップを利用して検出あるいは定量することができる。この場合、本発明疾患マーカーは当該DNAチップのプローブとして使用することができる(例えば、Affymetrix社のGeneChip Human Genome U95 A,B,C,D,Eの場合、25bpの長さのポリヌクレオチドプローブとして用いられる)。かかるDNAチップを、生体組織から採取したRNAをもとに調製される標識DNAまたはRNAとハイブリダイズさせ、該ハイブリダイズによって形成された上記プローブ(本発明疾患マーカー)と標識DNAまたはRNAとの複合体を、該標識DNAまたはRNAの標識を指標として検出することにより、生体組織中でのMLTK遺伝子の発現の有無または発現レベル(発現量)が評価できる。

【0064】上記DNAチップは、配列番号1-4のいずれかで示される塩基配列を有する遺伝子と結合し得る1種または2種以上の本発明疾患マーカーを含んでいればよい。複数の疾患マーカーを含むDNAチップの利用によれ



ば、ひとつの生体試料について、同時に複数の遺伝子の発現の有無または発現レベルの評価が可能である。

【0065】本発明疾患マーカーは、糖・脂質代謝異常疾患の診断、検出(罹患の有無、罹患の程度の診断)に有用である。具体的には、該疾患マーカーを利用した糖・脂質代謝異常疾患の診断は、被験者の筋肉組織と正常者の筋肉組織におけるMLTK遺伝子の発現レベルの違いを判定することによって行うことができる。

【0066】この場合、遺伝子発現レベルの違いには、発現のある／なしの違いだけでなく、被験者の筋肉組織と正常者の筋肉組織の両者ともに発現がある場合でも、両者間の発現量の格差が2倍以上、好ましくは3倍以上の場合が含まれる。より具体的には、MLTK遺伝子は、糖・脂質代謝異常疾患患者において特異的な発現上昇を示すので、被験者の筋肉組織において発現されており、該発現量が正常な筋肉組織における発現量と比べて好ましくは2倍以上、より好ましくは3倍以上多ければ、該被験者について糖・脂質代謝異常疾患の罹患が疑われる。

【0067】(1-3) 抗体

本発明は、糖・脂質代謝異常疾患の疾患マーカーとしてのMLTK遺伝子の発現産物(蛋白質)(本明細書においては「MLTK」または「MLTK蛋白質」ともいう)を特異的に認識することができる抗体を提供する。

【0068】MLTKとしては、配列番号1-4に示されるポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質を挙げることができる。配列番号1-4に示される各ポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質の具体的な態様としては、それぞれ配列番号5-8で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質を挙げることができる。

【0069】ここで配列番号5に示す蛋白質は、ヒト由来のMLTK $\alpha$ 遺伝子によってコードされる蛋白質である。配列番号6に示す蛋白質は、ヒト由来のMLTK $\beta$ 遺伝子によってコードされる蛋白質である。配列番号7に示す蛋白質は、マウス由来のMLTK $\alpha$ 遺伝子によってコードされる蛋白質である。また配列番号8に示す蛋白質は、マウス由来のMLTK $\beta$ 遺伝子によってコードされる蛋白質である。それらの蛋白質およびそれらの蛋白質の取得方法は、J. Biol. Chem., Vol.276, No.6, pp.4276-4286 (Feb. 9, 2001)に記載されるように公知である。

【0070】本発明の抗体は、その形態に特に制限はなく、MLTKを免疫抗原とするポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。さらに当該MLTKのアミノ酸配列中の少なくとも連続する8アミノ酸からなるポリペプチドに対して抗原結合性を有する抗体も、本発明抗体に含まれる。

【0071】これらの抗体の製造方法は、すでに周知である。本発明抗体はこれらの常法に従って製造することができる(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.12-11.13)。具体的には、ポリクロー

ナル抗体は、常法に従って大腸菌などで発現し精製したMLTKを用いて、あるいは常法に従って当該MLTKの部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドを合成して、家兎などの非ヒト動物に免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。一方、モノクローナル抗体は、常法に従って大腸菌などで発現し精製したMLTKまたは該蛋白質の部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドをマウスなどの非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞から得ることができる(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4-11.11)。

【0072】抗体の作製に免疫抗原として使用されるMLTK蛋白質は、本発明により提供される遺伝子の配列情報(配列番号1-4)に基づいて、DNAクローニング、各プラスミドの構築、宿主へのトランスフェクション、形質転換体の培養および培養物からの蛋白質の回収の操作により得ることができる。これらの操作は、当業者に既知の方法、文献記載の方法(Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983), DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985))などに準じて行うことができる。

【0073】具体的には、MLTKをコードする遺伝子が所望の宿主細胞中で発現できる組み換えDNA(発現ベクター)を作製し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換体を培養して、得られる培養物から、目的蛋白質を回収することによって、本発明抗体の製造のための免疫抗原としての蛋白質を得ることができる。また、MLTK蛋白質は、本発明により提供されるアミノ酸配列情報(配列番号5-8)に従って、一般的な化学合成法(ペプチド合成)によって製造することもできる。

【0074】本発明MLTK蛋白質には、配列番号5-8に示す各アミノ酸配列を有する蛋白質のみならず、その相同物も包含される。該相同物としては、上記各アミノ酸配列において、1もしくは複数(通常数個)のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、且つもとの各アミノ酸配列の蛋白質と同等の生物学的機能を有する蛋白質および／または同等の免疫学的活性を有する蛋白質を挙げることができる。

【0075】ここで、同等の生物学的機能を有する蛋白質としては、MLTKと生化学的または薬理学的機能において同等の蛋白質を挙げることができる。また、同等の免疫学的活性を有する蛋白質としては、適当な動物あるいはその細胞において特定の免疫反応を誘発し、かつMLTKに対する抗体と特異的に結合する能力を有する蛋白質を挙げることができる。

【0076】なお、蛋白質におけるアミノ酸の変異数および変異部位は、その生物学的機能および／または免疫学的活性が保持される限り制限はない。生物学的機能または免疫学的活性を消失することなくアミノ酸残基が、

どのように、何個置換、挿入あるいは欠失されればよいかを決定する指標は、当業者に周知のコンピュータプログラム、例えばDNA Star softwareを用いて見出すことができる。例えば変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内である。また置換されるアミノ酸は、置換後に得られる蛋白質がMLTKの生物学的機能および／または免疫学的活性を保持している限り、特に制限されない。この置換されるアミノ酸は、蛋白質の構造保持の観点から、アミノ酸の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性、両親媒性などにおいて置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、PheおよびTrpは互いに非極性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、AsnおよびGlnは互いに非荷電性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、AspおよびGluは互いに酸性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、またLys、ArgおよびHisは互いに塩基性アミノ酸に分類されるアミノ酸である。ゆえに、これらを指標として同群に属するアミノ酸を適宜選択することができる。

【0077】本発明抗体は、また、MLTKの部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドを用いて調製されるものであってもよい。かかる抗体の製造のために用いられるオリゴペプチドは、機能的な生物活性を有することは要しないが、MLTKと同様の免疫原特性を有するものであることが望ましい。好ましくはこの免疫原特性を有し且つMLTKのアミノ酸配列において少なくとも連続する8アミノ酸、好ましくは15アミノ酸、より好ましくは20アミノ酸からなるオリゴペプチドを例示することができる。

【0078】かかるオリゴペプチドに対する抗体の製造は、宿主に応じて種々のアジュバントを用いて免疫学的反応を高めることによって行うこともできる。限定はされないが、そのようなアジュバントには、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、並びにリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニンおよびジニトロフェノールのような表面活性物質、BCG(カルメットーゲラン桿菌)やコリネバクテリウム・パルヴムなどのヒトアジュバントが含まれる。

【0079】本発明抗体は、MLTKに特異的に結合する性質を有することから、該抗体を利用することによって、被験者の組織内に発現した上記蛋白質(MLTK)を特異的に検出することができる。すなわち、当該抗体は被験者の組織内におけるMLTKの発現の有無およびその発現の程度を検出するためのプローブとして有用である。

【0080】具体的には、患者の筋肉組織などの一部をバイオプシなどで採取し、そこから常法に従って蛋白質を調製して、例えばウェスタンブロット法、ELISA法など公知の検出方法において、本発明抗体を常法に従って

プローブとして使用することによって、上記筋肉組織などに存在するMLTKを検出することができる。

【0081】糖・脂質代謝異常疾患の診断に際しては、被験者の筋肉組織などに存在するMLTK量を、正常者の筋肉組織などに存在するMLTK量と対比して、その違いを判定すればよい。この場合、蛋白質の量の違いには、蛋白質のある／なしと共に、蛋白質の量の違いが2倍以上、好ましくは3倍以上の場合が含まれる。具体的には、MLTK遺伝子は、糖・脂質代謝異常疾患において有意な発現誘導を示すので、被験者の筋肉組織に該遺伝子の発現産物(MLTK)が存在しており、該存在量が正常な筋肉組織における同発現産物量と比べて2倍以上、好ましくは3倍以上多いことが判定されれば、糖・脂質代謝異常疾患の罹患が疑われる。

【0082】(2)糖・脂質代謝異常疾患の検出方法(診断方法)

本発明は、前述した本発明疾患マーカーを利用した糖・脂質代謝異常疾患の検出方法(診断方法)を提供する。

【0083】具体的には、本発明の検出方法は、被験者の筋肉組織などの一部をバイオプシなどで採取し、そこに含まれる糖・脂質代謝異常疾患に関連するMLTK遺伝子の発現レベル(発現量)、または該遺伝子に由来するMLTK蛋白質を検出、測定することにより、糖・脂質代謝異常疾患の罹患の有無またはその程度を検出(診断)するものである。また、本発明の検出(診断)方法は、例えば糖・脂質代謝異常疾患患者において、該疾患の改善のために治療薬などを投与した場合における、該疾患の改善の有無またはその程度を診断することもできる。

【0084】本発明の検出方法は、次の(a)、(b)および(c)の工程を含む：

(a) 被験者の生体試料と本発明疾患マーカーを接触させる工程、(b) 生体試料中のMLTK遺伝子の遺伝子発現レベルまたはMLTK蛋白質の量を、上記疾患マーカーを指標として測定する工程、(c) 上記(b)の結果をもとに、糖・脂質代謝異常疾患の罹患を判断する工程。

【0085】ここで用いられる生体試料は、被験者の筋肉組織などのMLTK遺伝子を発現可能な細胞を含む組織、これの組織から調製されるRNAもしくはそれらからさらに調製されるポリヌクレオチドまたは上記組織から調製される蛋白質である。これらのRNA、ポリヌクレオチドおよび蛋白質は、例えば被験者の筋肉組織の一部をバイオプシなどで採取後、常法に従って調製することができる。

【0086】本発明の診断方法は、測定対象として用いる生体試料の種類に応じて、具体的には下記のようにして実施される。

【0087】(2-1) 測定対象の生体試料としてRNAを利用する場合

生体試料としてRNAを利用する場合、本発明検出方法(診断方法)は、該RNA中のMLTK遺伝子の発現レベルを検出

し、測定することによって実施される。具体的には、前述のポリヌクレオチドからなる本発明疾患マーカー(MLTK遺伝子の塩基配列中の連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドおよび/または該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド)をプライマーまたはプローブとして用いて、ノーザンブロット法、RT-PCR法、DNAチップ解析法、in situハイブリダイゼーション解析法などの公知の方法を行うことにより実施できる。

【0088】ノーザンブロット法を利用する場合、本発明疾患マーカーをプローブとして用いることによって、RNA中のMLTK遺伝子の発現の有無および発現レベルを検出、測定することができる。具体的には、まず本発明疾患マーカー(相補鎖)を放射性同位元素( $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ など:RI)、蛍光物質などで標識する。次いで、得られる標識疾患マーカーを常法に従ってナイロンメンブレンなどにトランスファーした被験者の生体組織由来のRNAとハイブリダイズさせる。その後、形成された標識疾患マーカー(DNA)とRNAとの二重鎖を、該標識疾患マーカーの標識物(RI、蛍光物質など)に由来するシグナルを放射線検出器(BAS-1800II、富士フィルム社製)、蛍光検出器などで検出、測定する方法を例示することができる。

【0089】また、AlkPhos Direct Labelling and Detection System (Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いて、該プロトコールに従って疾患マーカー(プローブDNA)を標識し、被験者の生体組織由来のRNAとハイブリダイズさせた後、疾患マーカーの標識物に由来するシグナルをマルチバイオイメージャーSTORM860 (Amersham Pharmacia Biotech社製)で検出、測定する方法を採用することもできる。

【0090】RT-PCR法を利用する場合、本発明疾患マーカーをプライマーとして用いて、RNA中のMLTK遺伝子の発現の有無および発現レベルを検出、測定することができる。具体的には、まず被験者の生体組織由来のRNAから常法に従ってcDNAを調製し、これを鋳型として標的のMLTK遺伝子の領域が増幅できるように、本発明疾患マーカーから調製した一対のプライマー(上記cDNA(一鎖)に結合する正鎖、+鎖に結合する逆鎖)をこれとハイブリダイズさせる。その後、常法に従ってPCR法を行い、得られた増幅二本鎖DNAを検出する。

【0091】増幅された二本鎖DNAの検出には、予めRI、蛍光物質などで標識しておいたプライマーを用いて上記PCRを行うことによって産生される標識二本鎖DNAを検出する方法、産生された二本鎖DNAを常法に従ってナイロンメンブレンなどにトランスファーさせて、標識した疾患マーカーをプローブとして使用してこれとハイブリダイズさせて検出する方法などを用いることができる。生成された標識二本鎖DNA産物はアジレント2100バイオアナライザ(横河アナリティカルシステムズ社製)などで測定することができる。また、SYBR Green RT-PCR Reagents (Applied Biosystems社製)で該プロトコール

に従ってRT-PCR反応液を調製し、ABI PRIME 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems 社製)で反応させて、該反応物を検出することもできる。

【0092】DNAチップ解析を利用する場合、本発明疾患マーカーをDNAプローブ(1本鎖または2本鎖)として貼り付けたDNAチップを用意し、これに被験者の生体組織由来のRNAから常法によって調製されたcRNAをハイブリダイズさせ、形成されたDNAとcRNAとの二本鎖を、本発明疾患マーカーから調製される標識プローブと結合させてMLTK遺伝子の発現の有無および発現レベルを検出、測定することができる。また、上記DNAチップとして、MLTK遺伝子の遺伝子発現レベルを検出、測定可能なDNAチップを用いることもできる。該DNAチップとしては、例えばAffymetrix社のGene Chip Human Genome U95 A, B, C, D, Eを挙げることができる。かかるDNAチップを用いた、被験者RNA中のMLTK遺伝子の遺伝子発現レベルの検出、測定については、実施例に詳述する。

【0093】(2-2) 測定対象の生体試料として蛋白質を用いる場合

測定対象として蛋白質を用いる場合、本発明検出(診断)方法は、生体試料中のMLTKを検出し、その量(レベル)を測定することによって実施される。具体的には、本発明疾患マーカーとして抗体(配列番号5-8で示される各アミノ酸配列からなる蛋白質を認識する抗体)を用いて、ウエスタンブロット法などの公知方法で、MLTKを検出、定量する。

【0094】ウエスタンブロット法は、一次抗体として本発明疾患マーカーを用いた後、二次抗体として $^{125}\text{I}$ などの放射性同位元素、蛍光物質などで標識した標識抗体(一次抗体に結合する標識抗体)を用い、得られる標識結合物の放射性同位元素、蛍光物質などに由来するシグナルを放射線測定器(BAS-1800II:富士フィルム社製など)、蛍光検出器などで検出し、測定することによって実施できる。また、一次抗体として本発明疾患マーカーを用いた後、ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Pharmacia Biotech 社製)を用いて、該プロトコールに従って検出し、マルチバイオイメージャーSTORM860 (Amersham Pharmacia Biotech 社製)で測定することもできる。

【0095】尚、上記において測定対象とするMLTK蛋白質の機能または活性は、既に知られており、該蛋白質の量と機能乃至活性とは一定の相関関係を有している。従って、上記蛋白質の量の測定に代えて、該蛋白質の機能または活性の測定を行うことによっても、本発明の糖・脂質代謝異常疾患の検出(診断)を実施することができる。すなわち、本発明は、MLTK蛋白質の機能または活性を指標として、これを公知の方法に従って測定、評価することからなる、糖・脂質代謝異常疾患の検出(診断)方法をも包含する。

【0096】(2-3) 糖・脂質代謝異常疾患の診断

糖・脂質代謝異常疾患の診断は、被験者の筋肉組織などにおけるMLTK遺伝子の遺伝子発現レベルまたはMLTK遺伝子の発現産物である蛋白質(MLTK)の量、機能もしくは活性(以下これらを合わせて「蛋白質レベル」ということがある)を、正常な筋肉組織などにおける当該遺伝子発現レベルまたは当該蛋白質レベルと比較し、両者の違いを判定することによって行うことができる。

【0097】この場合、正常な筋肉組織などから採取、調製した生体試料(RNAまたは蛋白質)が必要であるが、これは糖・脂質代謝異常疾患に罹患していない人の筋肉組織などをバイオプシなどで採取することによって取得することができる。なお、ここで「糖・脂質代謝異常疾患に罹患していない人」とは、少なくとも糖・脂質代謝異常疾患の自覚症状がなく、好ましくは他の検査方法、例えば経口糖負荷試験法などによる検査の結果、糖・脂質代謝異常疾患でない人と診断された人をいう。当該「糖・脂質代謝異常疾患に罹患していない人」を、本明細書では単に正常者という場合もある。

【0098】被験者の組織と正常組織(糖・脂質代謝異常疾患に罹患していない人の組織)との遺伝子発現レベルまたは蛋白質レベルの比較は、被験者の生体試料と正常者の生体試料を対象とした測定を並行して行うことで実施できる。また、並行して行わなくても、複数(少なくとも2、好ましくは3以上、より好ましくは5以上)の正常組織を用いて均一な測定条件で測定して得られたMLTK遺伝子の遺伝子発現レベルもしくは該遺伝子の発現産物であるMLTK蛋白質レベルの平均値または統計的中間値を予め求めておき、これを正常者の遺伝子発現レベルもしくは蛋白質レベル(正常値)として、被験者における測定値の比較に用いることができる。

【0099】被験者が、糖・脂質代謝異常疾患であるかどうかの判断は、該被験者の組織におけるMLTK遺伝子の遺伝子発現レベルまたはその発現産物であるMLTK蛋白質レベルが、正常者のそれらと比較して2倍以上、好ましくは3倍以上多いことを指標として行うことができる。被験者の遺伝子発現レベルまたは蛋白質レベルが正常者のそれらのレベルに比べて多ければ、該被験者は糖・脂質代謝異常疾患であると判断できるか、該疾患の罹患が疑われる。

【0100】(3)候補薬のスクリーニング方法

(3-1)遺伝子発現レベルを指標とするスクリーニング方法

本発明は、配列番号1-4に記載の塩基配列で代表されるMLTK遺伝子の発現を抑制する物質をスクリーニングする方法を提供する。

【0101】本発明のスクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)および(c)を含む：

(a) 被験物質とMLTK遺伝子を発現可能な細胞とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた細胞のMLTK遺伝子の発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない

対照細胞の上記遺伝子の発現量と比較する工程、(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、MLTK遺伝子の発現量を減少させる被験物質を選択する工程。

【0102】かかるスクリーニングに用いられる細胞としては、内在性および外来性を問わず、MLTK遺伝子を発現可能な細胞を挙げることができる。具体的にはMLTK遺伝子は正常組織では筋肉、心臓および脂肪で特異的に発現しているので、これらの組織に由来する細胞が挙げられ、特に筋肉由来の細胞が挙げられる。その例としては、L6筋筒細胞などを挙げることができる。また、脂肪由来の細胞である3T3-L1脂肪細胞株も挙げることができる。さらに、高脂肪食を負荷して作製した高脂肪食負荷マウスもしくは肥満糖尿病モデルマウスであるC57BL/Ks j-db/db Jclマウス(日本クレア)、KKAy/Ta Jclマウス(日本クレア)から単離・調製した初代筋肉培養細胞なども挙げることができる。なお、本発明スクリーニング法に用いられる細胞には、細胞の集合体である組織、例えば筋肉組織、心臓組織、脂肪組織なども含まれる。

【0103】本発明スクリーニング方法によってスクリーニングされる被験物質(候補物質)は、制限されないが、核酸(MLTK遺伝子のアンチセンスヌクレオチドを含む)、ペプチド、蛋白質、有機化合物、無機化合物などであり、本発明スクリーニングは、具体的にはこれらの被験物質またはこれらを含む試料(被験試料)を上記細胞および/または組織と接触させることにより行われる。被験試料としては、被験物質を含む、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これらに制限されない。

【0104】本発明スクリーニングに際して、被験物質と細胞とを接触させる条件は、特に制限されないが、該細胞が死滅せず且つMLTK遺伝子を発現できる培養条件(温度、pH、培地組成など)を選択するのが好ましい。

【0105】実施例に示すように、糖・脂質代謝異常疾患に罹患した患者の筋肉組織では、正常な筋肉組織に比して、MLTK遺伝子の発現レベルの有意な上昇が認められる。また、高脂肪食負荷モデル動物および肥満糖尿病モデル動物の筋肉組織においても、同様のMLTK遺伝子の発現上昇が認められ、しかも糖尿病治療薬の投与によって病態が改善されると、このMLTK遺伝子の発現量の低下(正常化)が認められる。本発明スクリーニング方法には、このMLTK遺伝子の発現レベルを指標として、その発現を抑制する物質(発現レベルを正常レベルに戻す物質)を探索する方法が包含される。このスクリーニング方法によって、糖・脂質代謝異常疾患の予防、改善乃至治療薬の有効成分となる候補物質を提供することができる。

【0106】候補物質は、具体的には、被験物質(候補物質)の存在下で培養した細胞におけるMLTK遺伝子の発現レベルが、被験物質(候補物質)の非存在下で培養した対照細胞におけるMLTK遺伝子の発現レベルに比して低く

なる場合に、選択することができる。

【0107】なお、本発明スクリーニング法に従うMLTK遺伝子の発現レベルの検出および定量は、前記細胞から調製したRNAまたは該RNAから転写された相補的ポリヌクレオチドと、本発明疾患マーカーとを用いて、前記(2-1)項に記述したように、ノーザンブロット法、RT-PCR法など公知の方法、DNAチップなどを利用する方法などに従って実施できる。指標とする遺伝子発現レベルの低下(抑制、減少)の程度は、被験物質(候補物質)を存在させた細胞におけるMLTK遺伝子の発現が、被験物質(候補物質)を存在させない対照細胞におけるMLTK遺伝子発現量と比較して、10%、好ましくは30%、特に好ましくは50%以上の低下(抑制、減少)を例示することができる。

【0108】MLTK遺伝子の発現レベルの検出および定量は、MLTK遺伝子の発現を制御する遺伝子領域(発現制御領域)に、例えばルシフェラーゼ遺伝子などのマーカー遺伝子をつないだ融合遺伝子を導入した細胞株を用いて、マーカー遺伝子由来の蛋白質の活性を測定することによっても実施できる。本発明のMLTK遺伝子の発現抑制物質のスクリーニング方法には、かかるマーカー遺伝子の発現量を指標として標的物質を探索する方法も包含される。この意味において、請求項9に記載する「MLTK遺伝子」の概念には、MLTK遺伝子の発現制御領域とマーカー遺伝子との融合遺伝子が含まれる。

【0109】上記マーカー遺伝子としては、発光反応や呈色反応を触媒する酵素の構造遺伝子が好ましい。具体的には、上記ルシフェラーゼ遺伝子、分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 $\beta$ グルクロニダーゼ遺伝子、 $\beta$ ガラクトシダーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子などのレポーター遺伝子を例示できる。ここでMLTK遺伝子の発現制御領域としては、例えば該遺伝子の転写開始部位上流約1kb、好ましくは約2kbを用いることができる。融合遺伝子の作成およびマーカー遺伝子由来の活性測定は、公知の方法で行うことができる。

【0110】本発明スクリーニング方法により選択される物質は、MLTK遺伝子の遺伝子発現抑制剤として位置づけることができる。これらの物質は、MLTK遺伝子の発現を抑制することによって、糖・脂質代謝異常疾患を緩和、抑制(改善、治療)する薬物の有力な候補物質となる。

【0111】(3-2) 蛋白質の発現量を指標とするスクリーニング方法

本発明は、配列番号：5-8に記載のアミノ酸配列で代表されるMLTK(MLTK蛋白質)の発現量を抑制する物質をスクリーニングする方法を提供する。

【0112】本発明スクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)および(c)を含む：

(a) 被験物質とMLTKを発現可能な細胞または該細胞から調製した細胞画分とを接触させる工程、(b) 被験物質を

接触させた細胞または細胞画分におけるMLTKの発現量を測定し、該発現量を被験物質を接触させない対照細胞または細胞画分におけるMLTKの発現量と比較する工程、(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、MLTKの発現量を抑制する被験物質を選択する工程。

【0113】本発明スクリーニングに用いられる細胞は、内在性および外来性を問わず、MLTK遺伝子を発現し、発現産物としてのMLTKを有する細胞を挙げることができる。該細胞としては、具体的には、分化させた筋肉細胞、脂肪細胞、心筋細胞などを用いることができる。細胞画分とは、上記細胞に由来する各種の画分を意味し、これには、例えば、細胞膜画分、細胞質画分、細胞核画分などが含まれる。

【0114】実施例に示すように、糖・脂質代謝異常疾患の一種である糖尿病に罹患した患者の筋肉組織では、正常な筋肉組織に比して、MLTK遺伝子の発現上昇が観察され、該遺伝子の発現産物であるMLTKの増加がみられる。同様のことは、高脂肪食負荷モデル動物および肥満糖尿病モデル動物の筋肉組織においても観察される。しかもこれらのモデル動物では、糖尿病治療薬の投与によって病態が改善されると、上記MLTK遺伝子の発現産物であるMLTK蛋白質量が低下(正常化)する。この知見から、MLTK遺伝子がコードする蛋白質の発現量は、糖・脂質代謝異常疾患に関連すると考えられる。本発明スクリーニング方法は、MLTK遺伝子の発現産物である蛋白質の発現量が、糖・脂質代謝異常疾患と関連することを利用して、該蛋白質の量を指標として、該蛋白質の量を低下させる物質(正常レベルに戻す物質)を探索する方法を包含する。

【0115】本発明スクリーニング方法によれば、MLTKを抑制する物質を探索することによって、糖・脂質代謝異常疾患の予防薬、改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質、即ち、該疾患の緩和/抑制作用を有する(糖・脂質代謝異常疾患に対して改善/治療効果を発揮する)物質が提供される。

【0116】上記MLTKの量は、前述したように、例えば、本発明疾患マーカーとして抗体(配列番号5-8で示される各アミノ酸配列からなる蛋白質を認識する抗体)を用いたウエスタンブロット法などの公知方法に従って定量できる。ウエスタンブロット法は、一次抗体として本発明疾患マーカーを用いた後、二次抗体として $^{125}\text{I}$ などの放射性同位元素、蛍光物質などで標識した一次抗体に結合する抗体を用いて標識し、これら標識物質由来のシグナルを放射線測定器(BAS-1800II：富士フイルム社製など)、蛍光検出器などで測定することによって実施できる。また、一次抗体として本発明疾患マーカーを用いた後、ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Pharmacia Biotech 社製)を利用して、該プロトコルに従って検出し、マルチバイオイメージャーSTORM860(Amersham Pharmacia Biotech 社製)で測定する



こともできる。

【0117】本発明スクリーニング方法によってスクリーニングされる被験物質(候補物質)は、制限されないが、核酸、ペプチド、蛋白質、有機化合物、無機化合物などであり、本発明スクリーニングは、具体的にはこれらの被験物質またはこれらを含む試料(被験試料)を上記細胞または細胞画分と接触させることにより行われる。被験試料としては、被験物質を含む、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これらに制限されない。

【0118】(3-3) 蛋白質の機能(活性)を指標とするスクリーニング方法

本発明は、またMLTKの機能(活性)を抑制する物質をスクリーニングする方法を提供する。

【0119】本発明スクリーニング方法は、次の工程(a)、(b)および(c)を含む：

(a) 被験物質とMLTKを含む水溶液、細胞または該細胞から調製した細胞画分とを接触させる工程、(b) 被験物質を接触させた水溶液、細胞または細胞画分におけるMLTKの機能(活性)を測定し、該機能(活性)を被験物質を接触させない対照水溶液、対照細胞または細胞画分におけるMLTKの機能(活性)と比較する工程、(c) 上記(b)の比較結果に基づいて、MLTKの機能(活性)を抑制する被験物質を選択する工程。

【0120】本発明スクリーニングに用いられるMLTKを含む水溶液は、MLTKを含むものであればよく特に制限されない。その具体例としては、例えばMLTKの水溶液の他、MLTKを含む細胞溶解液、核抽出液あるいは細胞の培養上清などを例示することができる。本発明スクリーニングに用いられる細胞は、内在性および外来性を問わず、MLTK遺伝子を発現し、発現産物としてのMLTKを有する細胞を挙げることができる。該細胞としては、具体的には、前記(3-2)項に示されるような分化させた筋肉細胞、脂肪細胞、心筋細胞などを用いることができる。該細胞には、MLTK遺伝子(発現ベクター)で形質転換された形質転換細胞も包含される。該形質転換に用いられる宿主細胞としては、例えばL6、COS、CHO、L、Sf9などの周知の細胞を挙げることができる。また細胞画分とは、上記細胞に由来する各種の画分を意味し、これには、例えば細胞膜画分、細胞質画分、細胞核画分などが含まれる。

【0121】上記(3-2)項に記載したように、糖・脂質代謝異常疾患の一種である糖尿病に罹患した患者の筋肉組織では、正常な筋肉組織に比して、MLTK遺伝子の発現上昇が観察され、該遺伝子の発現産物であるMLTK量の増加とともに、該蛋白質の機能(活性)の亢進、活性化がみられる。同様に、高脂肪食負荷モデル動物および肥満糖尿病モデル動物の筋肉組織においても、MLTK遺伝子の発現産物であるMLTKの増加および該蛋白質の機能の亢進、

活性化が認められる。しかもこれらのモデル動物では、糖尿病治療薬の投与によって病態が改善されると、MLTKの機能は正常化する。この知見から、MLTK遺伝子がコードする蛋白質の機能(活性)は、糖・脂質代謝異常疾患に関連すると考えられる。本発明スクリーニング方法は、MLTK遺伝子がコードする蛋白質の機能(活性)を指標として、該蛋白質の機能(活性)を抑制する物質(正常レベルに戻す物質)を探索する方法を包含する。本発明スクリーニング方法によれば、MLTKの機能または活性を抑制する物質を探索でき、かくして、糖・脂質代謝異常疾患の予防薬、改善薬または治療薬の有効成分となる候補物質が提供される。

【0122】本発明スクリーニング方法によってスクリーニングされる被験物質(候補物質)は、制限されないが、核酸、ペプチド、蛋白質(MLTKに対する抗体を含む)、有機化合物、無機化合物などであり、本発明スクリーニングは、具体的にはこれらの被験物質またはこれらを含む試料(被験試料)を上記水溶液、細胞または細胞画分と接触させることにより行われる。被験試料としては、被験物質を含む、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これらに制限されない。

【0123】ところで、MLTKは様々なシグナル伝達系に関与するMAPキナーゼ(p38など)をリン酸化することによって活性化する作用を有している(J. Biol. Chem., Vol. 276, No. 6, pp. 4276-4286 (Feb. 9, 2001)など参照)。

【0124】従って、この公知の性質に基づいて、MLTKの機能を抑制する候補物質のスクリーニングは、リン酸化されたMAPキナーゼ量の減少(低下)を指標にして行うこともできる。この場合、候補物質は、具体的には、被験物質(候補物質)の存在下で培養した細胞培養液中のリン酸化MAPキナーゼ量が、被験物質(候補物質)の非存在下で培養した細胞培養液中のリン酸化MAPキナーゼ量に比して低くなる場合に、選択することができる。リン酸化MAPキナーゼ量の測定は、これを認識する抗体を利用して常法に従い実施することができる。

【0125】リン酸化MAPキナーゼを認識する抗体としては、例えば免疫原としてリン酸化MAPキナーゼを用いて、前述した本発明抗体の製造法と同様にして製造することができる。代表的市販品としては、例えばphospho-p38 MAPK抗体(Cell Signaling社製)などを挙げることができる。

【0126】上記リン酸化MAPキナーゼ量の減少(低下)を指標とする本発明スクリーニング方法は、筋肉細胞などのMLTK遺伝子発現細胞に代えて、MLTK遺伝子を挿入した発現用ベクターで形質転換した動物細胞などの、MLTK発現能を付与した細胞株を利用して実施することもできる。

【0127】発現用ベクターとしては、公知の各種のも



の、例えばpcDNA4/His MAX、pcDNA3.1(いずれもインビトロジェン社)などを使用することができる。形質転換する動物細胞としても、公知の各種のもの、例えばCOS 1、COS7、L6、3T3L1細胞などを利用することができる。MLTK遺伝子のベクターへの挿入、ベクターによる動物細胞の形質転換などの操作は、いずれも常法に従うことができる(例えば、J. Biol. Chem., Vol.276, No.6, pp.4276-4286 (Feb. 9, 2001)など参照)。

【0128】更に、前記リン酸化MAPキナーゼ量の測定に代えて、例えば上記MLTK発現能を付与した細胞株に、更にMAPキナーゼのリン酸化に応答するリポーター遺伝子を導入し、該リポーター遺伝子産物の測定を行うことによって、本発明スクリーニング方法を実施することができる。この方法はその効率面より好ましい方法である。

【0129】上記リポーター遺伝子としては、発光反応や呈色反応を触媒する酵素の構造遺伝子が好ましく、具体的にはルシフェラーゼ遺伝子、分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 $\beta$ グルクロニダーゼ遺伝子、 $\beta$ ガラクトシダーゼ遺伝子およびエクオリン遺伝子などを挙げることができる。これらを利用するアッセイ技術は公知(例えば、Biochem. Cell. Biol. 74, 585-593 (1996), Biologicals 26, 1-5 (1998)など参照)であり、本発明スクリーニング方法は、この公知の方法に準じて行うことができる。

【0130】リポーター遺伝子産物の測定は、用いるリポーター遺伝子の種類に応じて、それぞれ知られている。例えば、ルシフェラーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子などでは発光強度の測定によることができる。分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子、 $\beta$ ガラクトシダーゼ遺伝子では、発色反応の定量によることができる。クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子では、放射標識されたクロラムフェニコールのアセチル化をTLCで測定する方法によることができる。より具体的には、リポーター遺伝子産物の測定は、市販のキット、例えばMercuryTM In vivo Kinase Assay Kits、ルシフェラーゼ基質(LucLite; パッカード社製)などを用いて、実施することができる。

【0131】上記リポーター遺伝子産物量の測定により候補物質をスクリーニングする場合、候補物質は、その存在下で培養した細胞培養液中のリポーター遺伝子発現産物の量が、該候補物質の非存在下で培養した細胞培養液中のリポーター遺伝子発現産物量に比して低い場合に、選択することができる。

【0132】かくして選抜取得される被験物質は、糖・脂質代謝異常疾患を緩和、抑制(改善、治療)する薬物の有力な候補となる。

【0133】上記(3-1)乃至(3-3)に記載する本発明スクリーニング方法によって選別された候補物質は、さらに

糖・脂質代謝異常疾患モデル動物を用いた薬効試験、安全性試験、糖・脂質代謝異常疾患患者への臨床試験に供してもよく、これらの試験を実施することによって、より実用的な糖・脂質代謝異常疾患改善または治療薬を取得することができる。このようにして選別された物質は、さらにその構造解析結果に基づいて、化学的合成、生物学的合成(発酵)または遺伝子学的操作によって、工業的に製造することができる。

【0134】(4)糖・脂質代謝異常疾患の改善・治療剤本発明は、糖・脂質代謝異常疾患の予防、改善および治療剤を提供する。本発明により提供される糖・脂質代謝異常疾患には、具体的には、糖代謝異常疾患、糖尿病、高脂血症、肥満症などが包含される。

【0135】本発明はMLTK遺伝子および該遺伝子によりコードされる蛋白質が、糖・脂質代謝異常疾患と関連しているという新たな知見から、MLTK遺伝子(配列番号1-4)の発現を抑制する物質またはMLTK(配列番号5-8)の発現量もしくは機能(活性)を低下させる物質が、上記疾患の予防、改善または治療に有効であるという考えに基づくものである。すなわち、本発明の糖・脂質代謝異常疾患の予防、改善および治療剤は、MLTK遺伝子の発現を抑制する物質あるいはMLTKの発現量もしくは機能(活性)を抑制する物質を有効成分とする。

【0136】当該有効成分とするMLTK遺伝子の発現抑制物質あるいはMLTKの発現量もしくは機能(活性)の抑制物質は、本発明スクリーニング方法を利用して選別されたもののみならず、この選別された物質に関する情報に基づいて常法に従って化学・生化学的手法により、もしくは工業的に製造されたものであってもよい。

【0137】当該有効成分は、そのまましくは自体公知の薬学的に許容される担体(賦形剤、増量剤、結合剤、滑沢剤などが含まれる)、慣用の添加剤などと混合して医薬組成物として調製することができる。当該医薬組成物は、調製する形態(錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤などの経口投与剤;注射剤、点滴剤、外用剤、坐剤などの非経口投与剤)などに応じて経口投与または非経口投与することができる。また投与量は、有効成分の種類、投与経路、投与対象または患者の年齢、体重、症状などによって異なり一概に規定できない。通常、1日投与用量として、数mg-2g程度、好ましくは数十mg程度を、1日1回投与することもでき、また数回に分けて投与することができる。

【0138】上記有効成分物質がDNAによりコードされるものである場合は、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。更に、上記有効成分物質がMLTK遺伝子に対するアンチセンスヌクレオチドの場合は、そのまましくは遺伝子治療用ベクターにこれを組込むことにより、遺伝子治療を行うこともできる。これらの場合も、遺伝子治療用組成物の投与量、投与方法は患者の体重、年齢、症状などにより変動

し、当業者であれば適宜選択することが可能である。

【0139】上記アンチセンスヌクレオチドを利用する遺伝子治療につき詳述すれば、該遺伝子治療は、通常のこの種の遺伝子治療と同様にして、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその化学的修飾体を直接患者の体内に投与することにより目的遺伝子の発現を制御する方法、もしくはアンチセンスRNAを患者の標的細胞に導入することにより該細胞による目的遺伝子の発現を制御する方法により実施できる。

【0140】ここで「アンチセンスヌクレオチド」には、MLTK遺伝子の少なくとも8塩基以上の部分に対応するアンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスRNA、アンチセンスDNAなどが含まれる。その化学修飾体には、例えばホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホトリエステル、アルキルホスホナート、アルキルホスホアミデートなどの、細胞内への移行性または細胞内での安定性を高め得る誘導体 ("Antisense RNA and DNA" WILEY-LISS刊、1992年、pp.1-50、J. Med. Chem. 36, 1923-1937(1993))が含まれる。これらは常法に従い合成することができる。

【0141】アンチセンスヌクレオチドまたはその化学的修飾体は、細胞内でセンス鎖mRNAに結合して、目的遺伝子の発現、即ちMLTKの発現を制御することができ、かくしてMLTKの機能(活性)を制御することができる。

【0142】アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその化学的修飾体は、好ましくは5-200塩基、さらに好ましくは8-25塩基、最も好ましくは12-25塩基の長さを有するものとすればよい。その投与に当たり、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその化学的修飾体は、通常慣用される安定化剤、緩衝液、溶媒などを用いて製剤化され得る。

【0143】アンチセンスRNAを患者の標的細胞に導入する方法において、用いられるアンチセンスRNAは、好ましくは100塩基以上、より好ましくは300塩基以上、さらに好ましくは500塩基以上の長さを有するものとすればよい。また、この方法は、生体内の細胞にアンチセンス遺伝子を導入するin vivo法および一旦体外に取り出した細胞にアンチセンス遺伝子を導入し、該細胞を体内に戻すex vivo法を包含する(日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36 (1)、23-48 (1994)、実験医学増刊、12 (15)、全頁 (1994)など参照)。この内ではin vivo法が好ましく、これには、ウイルス的導入法(組換えウイルスを用いる方法)と非ウイルス的導入法がある(前記各文献参照)。

【0144】上記組換えウイルスを用いる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンプスウイルスなどのウイルスゲノ

ムにMLTK遺伝子のアンチセンスヌクレオチドを組み込んで生体内に導入する方法が挙げられる。この中では、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルスなどを用いる方法が特に好ましい。非ウイルス的導入法としては、リポソーム法、リポフェクション法などが挙げられ、特にリポソーム法が好ましい。他の非ウイルス的導入法としては、例えばマイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法なども挙げられる。

【0145】遺伝子治療用製剤組成物は、上述したアンチセンスヌクレオチドまたはその化学修飾体、これらを含む組換えウイルスおよびこれらウイルスが導入された感染細胞などを有効成分とするものである。該組成物の患者への投与形態、投与経路などは、治療目的とする疾患、症状などに応じて適宜決定できる。例えば注射剤などの適当な投与形態で、静脈、動脈、皮下、筋肉内などに投与することができ、また患者の疾患対象部位に直接投与、導入することもできる。in vivo法を採用する場合、遺伝子治療用組成物は、MLTK遺伝子のアンチセンスヌクレオチドを含む注射剤などの投与形態の他に、例えばMLTK遺伝子のアンチセンスヌクレオチドを含有するウイルスベクターをリポソームまたは膜融合リポソームに包埋した形態(センダイウイルス(HVJ)-リポソームなど)とすることができる。これらのリポソーム製剤形態には、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤などが含まれる。また、遺伝子治療用組成物は、上記MLTK遺伝子のアンチセンスヌクレオチドを含有するベクターを導入されたウイルスで感染された細胞培養液の形態とすることもできる。これら各種形態の製剤中の有効成分の投与量は、治療目的である疾患の程度、患者の年齢、体重などにより適宜調節することができる。通常、MLTK遺伝子に対するアンチセンスヌクレオチドの場合は、患者成人1人当たり約0.0001-100mg、好ましくは約0.001-10mgが数日ないし数カ月に1回投与される量とすればよい。アンチセンスヌクレオチドを含むレトロウイルスベクターの場合は、レトロウイルス力価として、1日患者体重1kg当たり約 $1 \times 10^3$  pfu- $1 \times 10^5$  pfuとなる量範囲から選ぶことができる。アンチセンスヌクレオチドを導入した細胞の場合は、 $1 \times 10^4$  細胞/body- $1 \times 10^5$  細胞/body程度を投与すればよい。

【0146】

【実施例】次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。しかし、本発明はこれらの実施例になんら限定されるものではない。

【0147】実施例1 正常および糖尿病状態の筋肉での遺伝子発現の変動解析

ヒト2型糖尿病患者の筋肉組織4サンプルとヒトの正常な筋肉組織25サンプルからそれぞれ調製したtotalRNAを用いて、DNAチップ解析を行った。DNAチップ解析は、Affymetrix社Gene Chip Human Genome U95A,B,C,D,Eを用い

て行った。具体的には、解析は、(1) total RNAからのcDNAの調製、(2) 該cDNAからラベル化cRNAの調製、(3) ラベル化cRNAのフラグメント化、(4) フラグメント化cRNAとプローブアレイとのハイブリダイズ、(5) プローブアレイの染色、(6) プローブアレイのスキャンおよび(7) 遺伝子発現解析の手順で行った。

【0148】(1) total RNAからのcDNAの調製  
ヒト2型糖尿病患者の筋肉組織4サンプルおよびヒトの正常な筋肉組織25サンプルから調製した各total RNA 10μgおよびT7-(dT)24プライマー(Amersham社製) 100pmolを含む11μLの混合液を、70℃で10分間加熱した後、氷上で冷却した。冷却後、SuperScript Choice System for cDNA Synthesis(Gibco-BRL社製)に含まれる5×First Strand cDNA Buffer 4μL、該キットに含まれる0.1M DTT (dithiothreitol) 2μLおよび該キットに含まれる10mM dNTP Mix 1μLを添加し、42℃で2分間加熱した。更に、該キットに含まれるSuper ScriptII RT 2μL(400U)を添加し、42℃で1時間加熱した後、氷上で冷却した。冷却後、DEPC処理水(ナカライテスク社製)91μL、該キットに含まれる5×Second Strand Reaction Buffer 30μL、10mM dNTP Mix 3μL、該キットに含まれるE. coli DNA Ligase 1μL(10U)、該キットに含まれるE. coli DNA Polymerase I 4μL(40U)および該キットに含まれるE. coli RNaseH 1μL(2U)を添加し、16℃で2時間反応させた。次いで、該キットに含まれるT4 DNA Polymerase 2μL(10U)を加え、16℃で5分間反応させた後、0.5M EDTA 10μLを添加した。次いで、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール溶液(ニッポンジーン社製)162μLを添加して混合した。該混合液を、予め室温、14,000rpm、30秒間遠心分離しておいたPhase Lock Gel Light (エッペンドルフ社製)に移し、室温で14,000rpm、2分間遠心分離した後、145μLの水層をエッペンドルフチューブに移した。得られた溶液に、7.5M酢酸アンモニウム溶液72.5μLおよびエタノール362.5μLを加えて混合した後、4℃、14,000rpm、20分間遠心分離した。遠心分離後、上清を捨て、作製したcDNAを含むDNAペレットを得た。その後、該ペレットに80%エタノール0.5mLを添加し、4℃、14,000rpm、5分間遠心分離した後、上清を捨てた。再度同様の操作を行った後、該ペレットを乾燥させ、DEPC処理水12μLに溶解した。

【0149】以上の操作によって、ヒト2型糖尿病患者の筋肉組織4サンプルおよびヒトの正常な筋肉組織25サンプル由来のtotal RNAからcDNAを取得した。

【0150】(2) cDNAからラベル化cRNAの調製  
上記(1)で調製した各cDNA溶液5μLに、DEPC処理水17μL、BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit (ENZO社製)に含まれる10×HY Reaction Buffer4μL、該キットに含まれる10×Biotin Labeled Ribonucleotides 4μL、該キットに含まれる10×DTT 4μL、該キットに含まれる10×RNase Inhibitor Mix 4μLおよび該キット

に含まれる20×T7 RNA Polymerase 2μLを混合し、37℃で5時間反応させた。反応後、該反応液にDEPC処理水60μLを加えた後、RNeasy Mini Kitを用いて添付プロトコールに従って、調製したラベル化cRNAを精製した。

【0151】(3) ラベル化cRNAのフラグメント化  
上記(3)で精製した各ラベル化cRNA 20μgを含む溶液に、5×Fragmentation Buffer(200mMトリス-酢酸、pH8.1(Sigma社製)、500mM酢酸カリウム(Sigma社製)および150mM酢酸マグネシウム(Sigma社製))8μLを加え、得られる反応液40μLを、94℃で35分間加熱した後、氷中に置いた。これによってラベル化cRNAをフラグメント化した。

【0152】(4) フラグメント化cRNAとプローブアレイとのハイブリダイズ  
上記(3)で得た各フラグメント化cRNA 40μLに、5nM Control Oligo B2(Amersham社製) 4μL、100×Control cRNA Cocktail 4μL、Herring sperm DNA(Promega社製) 40μg、Acetylated BSA(Gibco-BRL社製) 200μg、2×MES Hybridization Buffer (200mM MES、2M [Na<sup>+</sup>]、40mM EDTA、0.02% Tween20 (Pierce社製)、pH6.5-6.7) 200μLおよびDEPC処理水144μLを混合し、400μLのハイブリカクテルを得た。得られた各ハイブリカクテルを99℃で5分間加熱し、更に45℃で5分間加熱した。加熱後、室温で14,000rpm、5分間遠心分離し、ハイブリカクテル上清を得た。

【0153】一方、1×MESハイブリダイゼーションバッファーで満たしたHuman genome U95プローブアレイ(Affymetrix社製)を、ハイブリオープン内で、45℃、60rpmで10分間回転させた後、1×MESハイブリダイゼーションバッファーを除去してプローブアレイを調製した。上記で得られたハイブリカクテル上清200μLを該プローブアレイにそれぞれ添加し、ハイブリオープン内で45℃、60rpmで16時間回転させ、フラグメント化cRNAとハイブリダイズしたプローブアレイを得た。

【0154】(5) プローブアレイの染色  
上記(4)で得たハイブリダイズ済みプローブアレイのそれぞれから、ハイブリカクテルを回収除去した後、Non-Stringent Wash Buffer(6×SSPE(20×SSPE(ナカライテスク社製)を希釈)、0.01%Tween20および0.005%Antifoam 0-30(Sigma社製))で満たした。次に、Non-Stringent Wash BufferおよびStringent Wash Buffer(100mM MES、0.1M NaClおよび0.01%Tween20)をセットしたGeneChip Fluidics Station 400 (Affymetrix社製)の所定の位置に、フラグメント化cRNAとハイブリダイズしたプローブアレイを装着した。その後、染色プロトコールEuKGE-WS2に従って、一次染色液(10μg/mL Streptavidin Phycoerythrin (SAPE) (Molecular Probe社製)、2mg/mL Acetylated BSA、100mM MES、1M NaCl(Ambion社製)、0.05%Tween20および0.005%Antifoam 0-30)、および二次染色液(100μg/mL Goat IgG(Sigma社製)、3μg/mL Biotinylated A

nti-Streptavidin antibody (Vector Laboratories社製)、2mg/mL Acetylated BSA、100mM MES、1M NaCl、0.05%Tween20および0.005%Antifoam0-30)でそれぞれ染色した。

【0155】(6) プローブアレイのスキャンおよび(7) 遺伝子発現解析

上記(5)で染色した各プローブアレイをHP GeneArray Scanner (Affymetrix社製)に供し、染色パターンを読み取った。

【0156】染色パターンをもとにGeneChip Workstation System(Affymetrix社製)によってプローブアレイ上の遺伝子の発現を解析した。次に、解析プロトコールに従ってNormalizationおよび遺伝子発現の比較解析を行った。

【0157】以上のDNAチップ解析による遺伝子発現の比較解析結果から、正常筋肉組織に比べて2型糖尿病患者の筋肉組織で3倍以上の発現増を示したプローブを選抜した。

【0158】選抜したプローブの中から、さらにヒト2型糖尿病患者の筋肉組織で高頻度発現上昇しているプローブを選抜した。具体的には、DNAチップ解析結果から得られるAbs Callを指標にして、ヒト2型糖尿病患者の筋肉組織でのAbs Callが "Present"である例数が2例以上であるプローブを選抜した。

【0159】その結果、MLK-like mitogen-activated protein triple kinase (MLTK)遺伝子(プローブ名:76950 #at)を選抜した。MLTKは正常状態の筋肉と比較して糖尿病患者の筋肉では3.2倍の発現上昇が観察された。

【0160】実施例2 高脂肪食負荷マウスの作製と肥満糖尿病動物への糖尿病治療薬の投与  
正常マウスC57BL/6j(日本クレア)に4週齢から高脂肪食

(リサーチダイエット社製、D12492)を7ヶ月間負荷し、高脂肪食負荷マウスを作成した。作成した高脂肪食負荷マウスより筋肉を採取した(高脂肪食負荷群、n=2)。

【0161】また、通常食(リサーチダイエット社製、D124508)で飼育した正常マウスC57BL/6j(32週齢、日本クレア)より筋肉を採取した(正常群、n=2)。

【0162】また、肥満糖尿病モデルマウス(遺伝的糖尿病モデルマウス)であるC57BL/Ksj-db/db Jcl(日本クレア)の10週齢の雌より筋肉を採取した(遺伝的糖尿病群、n=2)。

【0163】更に、肥満糖尿病モデルマウスであるKKAy/Ta Jcl(日本クレア)の7週齢の雄に、ロシグリタゾン(Avandia、スミスクライン・ビーチャム(SKB))を10mg/kg/dayの投与量で1日/1回、37日間経口投与した(ロシグリタゾン投与群、n=3)。血糖値は同じ肥満糖尿病モデルマウスに溶媒のみを同様に投与した溶媒投与群(n=3)が平均362mg/dlであったのに対して、ロシグリタゾン投与群では平均205mg/kgに低下していた。各群マウスから筋肉を採取した。

【0164】実施例3 ノーザンブロット法によるMLTK $\beta$ の発現変化の評価  
実施例2で作製した各群マウスの筋肉から、Isogen(日本ジーン)を用いてtotalRNAを単離した。得られた各RNA 10 $\mu$ gを電気泳動後、ナイロンメンブレンに転写し、MLTK $\beta$ に特異的なcDNAをプローブとしてノーザンブロット法を実施し、転写レベルはBASを用いて定量的に解析した。

【0165】得られた結果(MLTK $\beta$ 発現量、比放射活性の相対量)を下記表1に示す。

【0166】

【表1】

	MLTK $\beta$ 発現量
正常群	43.9
高脂肪食負荷群	62.6
遺伝的糖尿病群(db/dbマウス)	68.7
溶媒投与群(KKAyマウス)	62.6
ロシグリタゾン投与群(KKAyマウス)	47.7

【0167】表1に示す結果より、高脂肪食負荷群、遺伝的糖尿病群(db/dbマウス)および溶媒投与群(KKAyマウス)においては、正常群と比較して、MLTK $\beta$ 発現量の上昇が観察されたが、ロシグリタゾン投与群(KKAyマウス)では、MLTK $\beta$ 発現量の低下が認められた。

【0168】実施例4 MLTK遺伝子の発現を抑制する物質のスクリーニング

ラット筋芽細胞株L6を $6 \times 10^3$  cells/ウェルの濃度で、96穴プレートに播種し、10%FBSを含む $\alpha$ -MEM培地で培養する。十分コンフルエントになった時点(Day0)で、培地を2%FBS含有 $\alpha$ -MEM培地に交換し、Day2およびDay3の細胞

を筋筒細胞として使用する。

【0169】上記で調整した筋筒細胞の本培養液(2% FBS含有 $\alpha$ -MEM)に、それぞれ100 $\mu$ M、10 $\mu$ Mおよび1 $\mu$ Mの濃度になるように被験物質を添加して、37 $^{\circ}$ C、CO $_2$ 濃度5%で細胞を2日間培養する。対照として、被験物質無添加の本培養液でも同様に細胞を培養する(コントロール)。

【0170】得られる各培養細胞からRNAを抽出し、この抽出されたRNAについて実施例1に記載の方法で、MLTK遺伝子の発現量を調べる。

【0171】コントロールと比べて、MLTK遺伝子の発現

量が10%、好ましくは30%、特に好ましくは50以上減少している系について、被検物質を糖・脂質代謝異常疾患の緩和、抑制(改善、治療)のための候補物質として選択する。

【0172】実施例5 MLTKの機能(活性)を抑制する物質のスクリーニング

この例は、分化した筋肉細胞の培養物中のリン酸化されたp38 (基質としてのMAPK)の量を測定することにより実施される、MLTKの機能または活性を抑制する物質(MLTK阻害剤)のスクリーニング法の例である。

【0173】被検物質として供試化合物の溶媒溶液を用い、その存在下および非存在下(溶媒のみ)で、筋肉細胞L6(ATCC受託細胞)を24時間培養(培地: 2% FBS含有 $\alpha$ -MEM、5% CO<sub>2</sub>、37°C、静置培養)する。得られる細胞培養液にRIPA bufferを添加して細胞を溶解し、細胞溶解液をSDS-PAGE法にて電気泳動した後、リン酸化p38を認識する抗体(phospho-p38 MAPK抗体、Cell Signaling社製)を用いてウエスタンブロット法を実施し、細胞溶解液におけるリン酸化p38の量を測定する。

【0174】この方法に従い、被検物質の存在下で培養した細胞培養液中のリン酸化p38量が、被検物質の非存在下で培養した細胞培養液中のそれに比して低下している場合に、供試化合物をMLTK阻害剤の有力な候補化合物として選択する。

【0175】実施例6 MLTKの機能(活性)を抑制する物質のスクリーニング

(1)MLTK安定発現株の樹立

(1-1)導入遺伝子ベクターの構築

MLTKのコード領域をAmpliTaQ(パーキンエルマー社)にてPCR法で増幅する。増幅した遺伝子断片を動物細胞で機能するプロモーター(pcDNA4/HisMax, invitrogen社)の下流に導入する。レポーター遺伝子(SEAP遺伝子)はp38応答配列を有するプロモーター下流に挿入して使用する。

【0176】(1-2)細胞株の樹立

COS細胞を10cm<sup>2</sup>培養皿に播種し、60-70%コンフルエントになるまで培養する。その後、無血清培地に転換し、上記で構築したMLTK導入遺伝子とレポーター遺伝子をLipofectamine-Plus (Gibco)と複合体を形成させたものに培地に添加する。5時間インキュベート後、10%FBSを含む培地に転換し、さらに8時間培養する。その後トリプシンEDTAで細胞を培養皿から剥離させ、ゼオシンと10%FBSを含む培地に懸濁し、10cm<sup>2</sup>培養皿に播種する。数日後に形成されるコロニーを単離し、MLTKスクリーニン

グ用安定発現株とする。

【0177】(2)MLTK阻害剤のスクリーニング

(2-1)細胞の調製

上記(1-2)で得たMLTKスクリーニング用安定発現株を96穴培養皿に播種し、10%FBS(Gibco)を培地中で60-70%コンフルエントになるまで培養する。これを発現細胞として使用する。

【0178】(2-2)被検物質の添加

上記(2-1)で調製した発現細胞の培地を使用前日に無血清の培地に交換する。使用当日に、培養皿の培地を除去し、その代わりに被検物質(2.5mM DMSO溶液)を適当な濃度で含有するD-MEM培地を添加し、37°Cで24時間培養する。

【0179】コントロールとして、被検物質を含まないD-MEM培地を用いて上記発現細胞同様にして培養する。

【0180】(2-3)蛍光測定によるSEAP量の定量

上記(2-2)で得た細胞培養物より上清を分取し、該上清中に含まれるSEAP量を基質の蛍光量変化により測定、定量する。

【0181】この方法に従い、被検物質の存在下で培養した細胞培養物の上清中のSEAP量が、コントロールである被検物質の非存在下で培養した細胞培養物上清中のそれに比して低下している場合に、被検物質をMLTK阻害剤の有力な候補物質として選択する。

【0182】

【発明の効果】本発明によって、糖・脂質代謝異常疾患、例えば糖代謝異常疾患、糖尿病、高脂血症、肥満症などの疾患で発現が有意に上昇している遺伝子(MLTK遺伝子)が明らかになった。この遺伝子は糖・脂質代謝異常疾患の疾患マーカー遺伝子(プローブおよびプライマー)として有用である。該マーカー遺伝子の利用によれば、糖・脂質代謝異常疾患が検出でき、またその病因の究明および高精度の診断が可能であり、これらによりより適切な治療を施すことも可能となる。

【0183】また、上記遺伝子の発現上昇と糖・脂質代謝異常疾患との関連から、該遺伝子の発現を抑制する化合物は、糖・脂質代謝異常疾患の治療薬として有用と考えられる。従って、この遺伝子の発現の抑制もしくは減少を指標とすることによって、糖・脂質代謝異常疾患の治療薬となり得る候補薬をスクリーニング選別することが可能である。本発明は、このような糖・脂質代謝異常疾患治療薬の開発技術をも提供する。

【0184】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Pharmaceuticals

<120> A marker of abnormal sugar-lipid disorders and use thereof

<130> 6102JP

<140>

<141>

&lt;150&gt; JP 2001-371420

&lt;151&gt; 2001-12-05

&lt;160&gt; 8

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2403

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(2403)

&lt;400&gt; 1

```

atg tcg tct ctc ggt gcc tcc ttt gtg caa att aaa ttt gat gac ttg 48
Met Ser Ser Leu Gly Ala Ser Phe Val Gln Ile Lys Phe Asp Asp Leu
      1              5              10              15
cag ttt ttt gaa aac tgc ggt gga gga agt ttt ggg agt gtt tat cga 96
Gln Phe Phe Glu Asn Cys Gly Gly Gly Ser Phe Gly Ser Val Tyr Arg
              20              25              30
gcc aaa tgg ata tca cag gac aag gag gtg gct gta aag aag ctc ctc 144
Ala Lys Trp Ile Ser Gln Asp Lys Glu Val Ala Val Lys Lys Leu Leu
              35              40              45
aaa ata gag aaa gag gca gaa ata ctc agt gtc ctc agt cac aga aac 192
Lys Ile Glu Lys Glu Ala Glu Ile Leu Ser Val Leu Ser His Arg Asn
              50              55              60
atc atc cag ttt tat gga gta att ctt gaa cct ccc aac tat ggc att 240
Ile Ile Gln Phe Tyr Gly Val Ile Leu Glu Pro Pro Asn Tyr Gly Ile
              65              70              75              80
gtc aca gaa tat gct tct ctg gga tca ctc tat gat tac att aac agt 288
Val Thr Glu Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Tyr Asp Tyr Ile Asn Ser
              85              90              95
aac aga agt gag gag atg gat atg gat cac att atg acc tgg gcc act 336
Asn Arg Ser Glu Glu Met Asp Met Asp His Ile Met Thr Trp Ala Thr
              100              105              110
gat gta gcc aaa gga atg cat tat tta cat atg gag gct cct gtc aag 384
Asp Val Ala Lys Gly Met His Tyr Leu His Met Glu Ala Pro Val Lys
              115              120              125
gtg att cac aga gac ctc aag tca aga aac gtt gtt ata gct gct gat 432
Val Ile His Arg Asp Leu Lys Ser Arg Asn Val Val Ile Ala Ala Asp
              130              135              140
gga gta ttg aag atc tgt gac ttt ggt gcc tct cgg ttc cat aac cat 480
Gly Val Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Ala Ser Arg Phe His Asn His
              145              150              155              160
aca aca cac atg tcc ttg gtt gga act ttc cca tgg atg gct cca gaa 528
Thr Thr His Met Ser Leu Val Gly Thr Phe Pro Trp Met Ala Pro Glu
              165              170              175
gtt atc cag agt ctc cct gtg tca gaa act tgt gac aca tat tcc tat 576
Val Ile Gln Ser Leu Pro Val Ser Glu Thr Cys Asp Thr Tyr Ser Tyr
              180              185              190
ggt gtg gtt ctc tgg gag atg cta aca agg gag gtc ccc ttt aaa ggt 624
Gly Val Val Leu Trp Glu Met Leu Thr Arg Glu Val Pro Phe Lys Gly

```



195	200	205	
ttg gaa gga tta caa gta gct tgg ctt gta gtg gaa aaa aac gag aga	672		
Leu Glu Gly Leu Gln Val Ala Trp Leu Val Val Glu Lys Asn Glu Arg			
210	215	220	
tta acc att cca agc agt tgc ccc aga agt ttt gct gaa ctg tta cat	720		
Leu Thr Ile Pro Ser Ser Cys Pro Arg Ser Phe Ala Glu Leu Leu His			
225	230	235	240
cag tgt tgg gaa gct gat gcc aag aaa cgg cca tca ttc aag caa atc	768		
Gln Cys Trp Glu Ala Asp Ala Lys Lys Arg Pro Ser Phe Lys Gln Ile			
245	250	255	
att tca atc ctg gag tcc atg tca aat gac acg agc ctt cct gac aag	816		
Ile Ser Ile Leu Glu Ser Met Ser Asn Asp Thr Ser Leu Pro Asp Lys			
260	265	270	
tgt aac tca ttc cta cac aac aag gcg gag tgg agg tgc gaa att gag	864		
Cys Asn Ser Phe Leu His Asn Lys Ala Glu Trp Arg Cys Glu Ile Glu			
275	280	285	
gca act ctt gag agg cta aag aaa cta gag cgt gat ctc agc ttt aag	912		
Ala Thr Leu Glu Arg Leu Lys Lys Leu Glu Arg Asp Leu Ser Phe Lys			
290	295	300	
gag cag gag ctt aaa gaa cga gaa aga cgt tta aag atg tgg gag caa	960		
Glu Gln Glu Leu Lys Glu Arg Glu Arg Arg Leu Lys Met Trp Glu Gln			
305	310	315	320
aag ctg aca gag cag tcc aac acc ccg ctg ctg cct tcc ttt gag att	1008		
Lys Leu Thr Glu Gln Ser Asn Thr Pro Leu Leu Pro Ser Phe Glu Ile			
325	330	335	
ggt gca tgg acg gaa gac gat gtg tat tgn tgg gtt cag cag ctc gtc	1056		
Gly Ala Trp Thr Glu Asp Asp Val Tyr Xaa Trp Val Gln Gln Leu Val			
340	345	350	
aga aaa ggt gac tct tca gca gag atg agt gta tat gca agc ttg ttt	1104		
Arg Lys Gly Asp Ser Ser Ala Glu Met Ser Val Tyr Ala Ser Leu Phe			
355	360	365	
aaa gaa aac aac att aca ggg aag cgg ctg ctg ctg ctg gag gaa gaa	1152		
Lys Glu Asn Asn Ile Thr Gly Lys Arg Leu Leu Leu Leu Glu Glu Glu			
370	375	380	
gac ctg aaa gac atg ggc att gtc tcc aag ggg cat atc att cac ttc	1200		
Asp Leu Lys Asp Met Gly Ile Val Ser Lys Gly His Ile Ile His Phe			
385	390	395	400
aag tca gcc att gag aaa tta acc cat gat tac ata aat ttg ttt cac	1248		
Lys Ser Ala Ile Glu Lys Leu Thr His Asp Tyr Ile Asn Leu Phe His			
405	410	415	
ttc cca cca cta att aag gac tca gga ggt gaa cct gaa gaa aat gag	1296		
Phe Pro Pro Leu Ile Lys Asp Ser Gly Gly Glu Pro Glu Glu Asn Glu			
420	425	430	
gaa aaa ata gtg aac ctg gaa ctg gtt ttt ggt ttt cac ttg aaa cca	1344		
Glu Lys Ile Val Asn Leu Glu Leu Val Phe Gly Phe His Leu Lys Pro			
435	440	445	
gga act ggc cca cag gat tgt aag tgg aaa atg tat atg gag atg gat	1392		
Gly Thr Gly Pro Gln Asp Cys Lys Trp Lys Met Tyr Met Glu Met Asp			
450	455	460	
ggg gat gaa att gca ata acc tac ata aaa gat gtg aca ttc aac act	1440		

Gly	Asp	Glu	Ile	Ala	Ile	Thr	Tyr	Ile	Lys	Asp	Val	Thr	Phe	Asn	Thr	
465					470				475					480		
aac	cta	cct	gat	gcg	gag	att	tta	aag	atg	aca	aag	cca	cca	ttt	gta	1488
Asn	Leu	Pro	Asp	Ala	Glu	Ile	Leu	Lys	Met	Thr	Lys	Pro	Pro	Phe	Val	
				485				490						495		
atg	gag	aag	tgg	att	gta	gga	ata	gca	aaa	agt	cag	act	gtg	gag	tgc	1536
Met	Glu	Lys	Trp	Ile	Val	Gly	Ile	Ala	Lys	Ser	Gln	Thr	Val	Glu	Cys	
			500					505						510		
act	gtc	aca	tat	gag	agt	gat	gtt	aga	act	cca	aaa	agc	act	aaa	cat	1584
Thr	Val	Thr	Tyr	Glu	Ser	Asp	Val	Arg	Thr	Pro	Lys	Ser	Thr	Lys	His	
			515					520						525		
gtc	cat	ttg	att	cag	tgg	agt	aga	aca	aaa	cct	cag	gat	gaa	gtg	aaa	1632
Val	His	Leu	Ile	Gln	Trp	Ser	Arg	Thr	Lys	Pro	Gln	Asp	Glu	Val	Lys	
			530					535						540		
gca	gtc	caa	ctt	gcc	att	cag	aca	tta	ttc	acc	aat	tca	gat	ggc	aac	1680
Ala	Val	Gln	Leu	Ala	Ile	Gln	Thr	Leu	Phe	Thr	Asn	Ser	Asp	Gly	Asn	
545				550				555						560		
cct	gga	agc	agg	tcc	gac	tca	agt	gct	gat	tgc	cag	tgg	tta	gat	act	1728
Pro	Gly	Ser	Arg	Ser	Asp	Ser	Ser	Ala	Asp	Cys	Gln	Trp	Leu	Asp	Thr	
				565				570						575		
ctg	agg	atg	cgg	cag	att	gca	tcc	aac	act	tct	tta	cag	cgt	tcc	cag	1776
Leu	Arg	Met	Arg	Gln	Ile	Ala	Ser	Asn	Thr	Ser	Leu	Gln	Arg	Ser	Gln	
				580				585						590		
agc	aat	cct	att	ctg	ggg	tca	ccg	ttc	ttc	tca	cac	ttt	gat	ggc	cag	1824
Ser	Asn	Pro	Ile	Leu	Gly	Ser	Pro	Phe	Phe	Ser	His	Phe	Asp	Gly	Gln	
				595				600						605		
gat	tcc	tac	gct	gct	gct	gtg	aga	cgg	ccc	cag	gtg	ccc	att	aag	tat	1872
Asp	Ser	Tyr	Ala	Ala	Ala	Val	Arg	Arg	Pro	Gln	Val	Pro	Ile	Lys	Tyr	
				610				615						620		
caa	cag	att	aca	cct	gtg	aac	cag	tcc	aga	agc	tcg	tct	cct	act	cag	1920
Gln	Gln	Ile	Thr	Pro	Val	Asn	Gln	Ser	Arg	Ser	Ser	Ser	Pro	Thr	Gln	
625				630				635						640		
tat	gga	ctg	acc	aaa	aac	ttc	tct	tcc	cta	cat	ctc	aac	tct	agg	gac	1968
Tyr	Gly	Leu	Thr	Lys	Asn	Phe	Ser	Ser	Leu	His	Leu	Asn	Ser	Arg	Asp	
				645				650						655		
agt	ggc	ttt	tcc	agt	ggc	aat	act	gac	acc	tct	tca	gag	agg	ggt	cga	2016
Ser	Gly	Phe	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Asp	Thr	Ser	Ser	Glu	Arg	Gly	Arg	
				660				665						670		
tac	tca	gac	aga	agc	agg	aac	aaa	tat	gga	cgt	ggt	agt	ata	tca	ctc	2064
Tyr	Ser	Asp	Arg	Ser	Arg	Asn	Lys	Tyr	Gly	Arg	Gly	Ser	Ile	Ser	Leu	

```

ctc cac caa ccc aac acc ata cca ggg atg cct ttg cac cct gag act 2256
Leu His Gln Pro Asn Thr Ile Pro Gly Met Pro Leu His Pro Glu Thr
      740      745      750
gac tca aga gcc agt gaa gag gac agc aaa gtc agc gaa ggg ggc tgg 2304
Asp Ser Arg Ala Ser Glu Glu Asp Ser Lys Val Ser Glu Gly Gly Trp
      755      760      765
aca aaa gtg gaa tac cgg aaa aag ccc cac agg cca tct ccc gcc aaa 2352
Thr Lys Val Glu Tyr Arg Lys Lys Pro His Arg Pro Ser Pro Ala Lys
      770      775      780
acc aat aaa gag aga gcc aga ggg gac cac cgt gga tgg aga aac ttt 2400
Thr Asn Lys Glu Arg Ala Arg Gly Asp His Arg Gly Trp Arg Asn Phe
785      790      795      800
tga 2403
<210> 2
<211> 1368
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1368)
<400> 2
atg tcg tct ctc ggt gcc tcc ttt gtg caa att aaa ttt gat gac ttg 48
Met Ser Ser Leu Gly Ala Ser Phe Val Gln Ile Lys Phe Asp Asp Leu
      1      5      10      15
cag ttt ttt gaa aac tgc ggt gga gga agt ttt ggg agt gtt tat cga 96
Gln Phe Phe Glu Asn Cys Gly Gly Gly Ser Phe Gly Ser Val Tyr Arg
      20      25      30
gcc aaa tgg ata tca cag gac aag gag gtg gct gta aag aag ctc ctc 144
Ala Lys Trp Ile Ser Gln Asp Lys Glu Val Ala Val Lys Lys Leu Leu
      35      40      45
aaa ata gag aaa gag gca gaa ata ctc agt gtc ctc agt cac aga aac 192
Lys Ile Glu Lys Glu Ala Glu Ile Leu Ser Val Leu Ser His Arg Asn
      50      55      60
atc atc cag ttt tat gga gta att ctt gaa cct ccc aac tat ggc att 240
Ile Ile Gln Phe Tyr Gly Val Ile Leu Glu Pro Pro Asn Tyr Gly Ile
      65      70      75      80
gtc aca gaa tat gct tct ctg gga tca ctc tat gat tac att aac agt 288
Val Thr Glu Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Tyr Asp Tyr Ile Asn Ser
      85      90      95
aac aga agt gag gag atg gat atg gat cac att atg acc tgg gcc act 336
Asn Arg Ser Glu Glu Met Asp Met Asp His Ile Met Thr Trp Ala Thr
      100      105      110
gat gta gcc aaa gga atg cat tat tta cat atg gag gct cct gtc aag 384
Asp Val Ala Lys Gly Met His Tyr Leu His Met Glu Ala Pro Val Lys
      115      120      125
gtg att cac aga gac ctc aag tca aga aac gtt gtt ata gct gct gat 432
Val Ile His Arg Asp Leu Lys Ser Arg Asn Val Val Ile Ala Ala Asp
      130      135      140
gga gta ctg aag atc tgt gac ttt ggt gcc tct cgg ttc cat aac cat 480
Gly Val Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Ala Ser Arg Phe His Asn His

```

145	150	155	160	
aca aca cac atg tcc ttg gtt gga act ttc cca tgg atg gct cca gaa	528			
Thr Thr His Met Ser Leu Val Gly Thr Phe Pro Trp Met Ala Pro Glu				
165	170	175		
gtt atc cag agt ctc cct gtg tca gaa act tgt gac aca tat tcc tat	576			
Val Ile Gln Ser Leu Pro Val Ser Glu Thr Cys Asp Thr Tyr Ser Tyr				
180	185	190		
ggt gtg gtt ctc tgg gag atg cta aca agg gag gtc ccc ttt aaa ggt	624			
Gly Val Val Leu Trp Glu Met Leu Thr Arg Glu Val Pro Phe Lys Gly				
195	200	205		
ttg gaa gga tta caa gta gct tgg ctt gta gtg gaa aaa aac gag aga	672			
Leu Glu Gly Leu Gln Val Ala Trp Leu Val Val Glu Lys Asn Glu Arg				
210	215	220		
tta acc att cca agc agt tgc ccc aga agt ttt gct gaa ctg tta cat	720			
Leu Thr Ile Pro Ser Ser Cys Pro Arg Ser Phe Ala Glu Leu Leu His				
225	230	235	240	
cag tgt tgg gaa gct gat gcc aag aaa cgg cca tca ttc aag caa atc	768			
Gln Cys Trp Glu Ala Asp Ala Lys Lys Arg Pro Ser Phe Lys Gln Ile				
245	250	255		
att tca atc ctg gag tcc atg tca aat gac acg agc ctt cct gac aag	816			
Ile Ser Ile Leu Glu Ser Met Ser Asn Asp Thr Ser Leu Pro Asp Lys				
260	265	270		
tgt aac tca ttc cta cac aac aag gcg gag tgg agg tgc gaa att gag	864			
Cys Asn Ser Phe Leu His Asn Lys Ala Glu Trp Arg Cys Glu Ile Glu				
275	280	285		
gca act ctt gag agg cta aag aaa cta gag cgt gat ctc agc ttt aag	912			
Ala Thr Leu Glu Arg Leu Lys Lys Leu Glu Arg Asp Leu Ser Phe Lys				
290	295	300		
gag cag gag ctt aaa gaa cga gaa aga cgt tta aag atg tgg gag caa	960			
Glu Gln Glu Leu Lys Glu Arg Glu Arg Arg Leu Lys Met Trp Glu Gln				
305	310	315	320	
aag ctg aca gag cag tcc aac acc ccg ctt ctc ttg cct ctt gct gca	1008			
Lys Leu Thr Glu Gln Ser Asn Thr Pro Leu Leu Leu Pro Leu Ala Ala				
325	330	335		
aga atg tct gag gag tct tac ttt gaa tct aaa aca gag gag tca aac	1056			
Arg Met Ser Glu Glu Ser Tyr Phe Glu Ser Lys Thr Glu Glu Ser Asn				
340	345	350		
agt gca gag atg tca tgt cag atc aca gca aca agt aac ggg gag ggc	1104			
Ser Ala Glu Met Ser Cys Gln Ile Thr Ala Thr Ser Asn Gly Glu Gly				
355	360	365		
cat ggc atg aac cca agt ctg cag gcc atg atg ctg atg ggc ttt ggg	1152			
His Gly Met Asn Pro Ser Leu Gln Ala Met Met Leu Met Gly Phe Gly				
370	375	380		
gat atc ttc tca atg aac aaa gca gga gct gtg atg cat tct ggg atg	1200			
Asp Ile Phe Ser Met Asn Lys Ala Gly Ala Val Met His Ser Gly Met				
385	390	395	400	
cag ata aac atg caa gcc aag cag aat tct tcc aaa acc aca tct aag	1248			
Gln Ile Asn Met Gln Ala Lys Gln Asn Ser Ser Lys Thr Thr Ser Lys				
405	410	415		
aga agg ggg aag aaa gtc aac atg gct ctg ggg ttc agt gat ttt gac	1296			

Arg Arg Gly Lys Lys Val Asn Met Ala Leu Gly Phe Ser Asp Phe Asp  
 420 425 430  
 ttg tca gaa ggt gac gat gat gat gat gac ggt gag gag gag gat 1344  
 Leu Ser Glu Gly Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Gly Glu Glu Glu Asp  
 435 440 445  
 aat gac atg gat aat agt gaa tga 1368  
 Asn Asp Met Asp Asn Ser Glu  
 450 455  
  
 <210> 3  
 <211> 3146  
 <212> DNA  
 <213> Mouse  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (37)..(2445)  
 <400> 3  
 cgattttgtg gacgtttact actttgtcat tatgag atg tcg tct ctc gga gcc 54  
 Met Ser Ser Leu Gly Ala  
 1 5  
 tcc ttt gtg caa att aag ttc gac gac ttg cag ttt ttt gaa aac tgc 102  
 Ser Phe Val Gln Ile Lys Phe Asp Asp Leu Gln Phe Phe Glu Asn Cys  
 10 15 20  
 ggt gga gga agt ttt ggg agt gtg tat cga gcc aaa tgg ata tca cag 150  
 Gly Gly Gly Ser Phe Gly Ser Val Tyr Arg Ala Lys Trp Ile Ser Gln  
 25 30 35  
 gac aag gag gtg gct gta aag aag tta ctc aaa ata gag aaa gag gca 198  
 Asp Lys Glu Val Ala Val Lys Lys Leu Leu Lys Ile Glu Lys Glu Ala  
 40 45 50  
 gaa atc ctg agc gtc ctc agt cac aga aac atc atc cag ttt tat gga 246  
 Glu Ile Leu Ser Val Leu Ser His Arg Asn Ile Ile Gln Phe Tyr Gly  
 55 60 65 70  
 gtg att ctg gaa cct ccc aac tat ggc atc gtc aca gaa tat gct tcc 294  
 Val Ile Leu Glu Pro Pro Asn Tyr Gly Ile Val Thr Glu Tyr Ala Ser  
 75 80 85  
 ctg ggc tcc ctg tat gat tac att aac agc aac agg agt gaa gag atg 342  
 Leu Gly Ser Leu Tyr Asp Tyr Ile Asn Ser Asn Arg Ser Glu Glu Met  
 90 95 100  
 gac atg gaa cac atc atg acc tgg gcc act gac gta gcc aaa ggg atg 390  
 Asp Met Glu His Ile Met Thr Trp Ala Thr Asp Val Ala Lys Gly Met  
 105 110 115  
 cat tac tta cac atg gaa gct cct gtc aag gtg atc cac aga gac ctc 438  
 His Tyr Leu His Met Glu Ala Pro Val Lys Val Ile His Arg Asp Leu  
 120 125 130  
 aag tca aga aac gtt gtt atc gct gct gac gga gtg ctg aag atc tgt 486  
 Lys Ser Arg Asn Val Val Ile Ala Ala Asp Gly Val Leu Lys Ile Cys  
 135 140 145 150  
 gac ttc ggt gcc tcg cgg ttc cat aac cac aca aca cac atg tcc ttg 534  
 Asp Phe Gly Ala Ser Arg Phe His Asn His Thr Thr His Met Ser Leu  
 155 160 165

gtt gga act ttc cca tgg atg gct cca gaa gtt atc cag agt ctc cct 582  
 Val Gly Thr Phe Pro Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Gln Ser Leu Pro  
 170 175 180  
 gtg tct gaa acc tgt gac acg tat tcc tat ggt gtg gtt ctc tgg gag 630  
 Val Ser Glu Thr Cys Asp Thr Tyr Ser Tyr Gly Val Val Leu Trp Glu  
 185 190 195  
 atg cta aca agg gag gtc ccc ttt aaa ggt ttg gaa gga tta caa gta 678  
 Met Leu Thr Arg Glu Val Pro Phe Lys Gly Leu Glu Gly Leu Gln Val  
 200 205 210  
 gct tgg ctt gta gtg gaa aaa aac gag aga tta acc att cca agc agc 726  
 Ala Trp Leu Val Val Glu Lys Asn Glu Arg Leu Thr Ile Pro Ser Ser  
 215 220 225 230  
 tgc ccc aga agc ttt gct gaa ctg cta cac cag tgt tgg gag gct gat 774  
 Cys Pro Arg Ser Phe Ala Glu Leu Leu His Gln Cys Trp Glu Ala Asp  
 235 240 245  
 gcc aag aaa cgg cca tgc ttc aag caa atc att tca atc ctg gag tct 822  
 Ala Lys Lys Arg Pro Ser Phe Lys Gln Ile Ile Ser Ile Leu Glu Ser  
 250 255 260  
 atg tca aat gac acg aac ctt cct gac cag tgt aac tca ttt tta cac 870  
 Met Ser Asn Asp Thr Asn Leu Pro Asp Gln Cys Asn Ser Phe Leu His  
 265 270 275  
 aac aag gcg gag tgg agg tgt gaa att gag gca acc ctt gag cga ctg 918  
 Asn Lys Ala Glu Trp Arg Cys Glu Ile Glu Ala Thr Leu Glu Arg Leu  
 280 285 290  
 aag aaa cta gag cga gat ctc agc ttt aaa gag cag gag ctc aaa gaa 966  
 Lys Lys Leu Glu Arg Asp Leu Ser Phe Lys Glu Gln Glu Leu Lys Glu  
 295 300 305 310  
 cgg gag aga cgt ctc aag atg tgg gag cag aag ctg acg gag caa tcc 1014  
 Arg Glu Arg Arg Leu Lys Met Trp Glu Gln Lys Leu Thr Glu Gln Ser  
 315 320 325  
 aac acc ccg ctg ctg cct tcc ttt gag att ggt gcg tgg act gaa gac 1062  
 Asn Thr Pro Leu Leu Pro Ser Phe Glu Ile Gly Ala Trp Thr Glu Asp  
 330 335 340  
 gat gtg tat ttt tgg gtt cag cag ctc gtc aga aaa ggc gag tct tca 1110  
 Asp Val Tyr Phe Trp Val Gln Gln Leu Val Arg Lys Gly Glu Ser Ser  
 345 350 355  
 gta gag atg agt gga tac gca agt ttg ttt aag gag aac aac atc aca 1158  
 Val Glu Met Ser Gly Tyr Ala Ser Leu Phe Lys Glu Asn Asn Ile Thr  
 360 365 370  
 ggc aag cgg ttg ctg ctt ctg gaa gag gaa gat ctg aaa gac atg ggc 1206  
 Gly Lys Arg Leu Leu Leu Leu Glu Glu Glu Asp Leu Lys Asp Met Gly  
 375 380 385 390  
 atc gtc tcc aag gga cac atc att cac ttt aag tca gct att gag aag 1254  
 Ile Val Ser Lys Gly His Ile Ile His Phe Lys Ser Ala Ile Glu Lys  
 395 400 405  
 cta acc cac gat tat ctg aac ctg ttt cac ttc cca cca ctg att aag 1302  
 Leu Thr His Asp Tyr Leu Asn Leu Phe His Phe Pro Pro Leu Ile Lys  
 410 415 420



gat tca gga ggg gaa cct gaa gaa aat gag gaa aaa ata gtg aac ctt	1350
Asp Ser Gly Gly Glu Pro Glu Glu Asn Glu Glu Lys Ile Val Asn Leu	
425 430 435	
gaa ctt gtt ttt ggt ttt cac ttg aag cca gga act ggc cca cag gat	1398
Glu Leu Val Phe Gly Phe His Leu Lys Pro Gly Thr Gly Pro Gln Asp	
440 445 450	
tgc aaa tgg aaa atg tat atg gag atg gat ggg gac gaa gtt gca atc	1446
Cys Lys Trp Lys Met Tyr Met Glu Met Asp Gly Asp Glu Val Ala Ile	
455 460 465 470	
acg tac ata aaa gat gtg act ttc aac acg agc ctc cct gat gca gag	1494
Thr Tyr Ile Lys Asp Val Thr Phe Asn Thr Ser Leu Pro Asp Ala Glu	
475 480 485	
att tta aag atg aca aag cca cca ttt gta atg gag aag tgg atc gtg	1542
Ile Leu Lys Met Thr Lys Pro Pro Phe Val Met Glu Lys Trp Ile Val	
490 495 500	
gga ata gcg gag gat cag act gtg gag tgc acg gtc acc tat gag aat	1590
Gly Ile Ala Glu Asp Gln Thr Val Glu Cys Thr Val Thr Tyr Glu Asn	
505 510 515	
gat gtc aga aca cca aaa ctc act aag cac gtg cac tcc ata cag tgg	1638
Asp Val Arg Thr Pro Lys Leu Thr Lys His Val His Ser Ile Gln Trp	
520 525 530	
gac aga acg aag cct cag gat gag gtg aag gcg gtc cag ctt gcc att	1686
Asp Arg Thr Lys Pro Gln Asp Glu Val Lys Ala Val Gln Leu Ala Ile	
535 540 545 550	
cag act ctg ttc tcc agc tca gag ggc aac cct ggc agc aga tcc gac	1734
Gln Thr Leu Phe Ser Ser Ser Glu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser Asp	
555 560 565	
tcc agt gcg gac tgc caa tgg tta gac act ctg cgc atg cgg cag att	1782
Ser Ser Ala Asp Cys Gln Trp Leu Asp Thr Leu Arg Met Arg Gln Ile	
570 575 580	
gca tcc cac act tct cta cag cgt tcc caa agc aac cct atc ttg ggg	1830
Ala Ser His Thr Ser Leu Gln Arg Ser Gln Ser Asn Pro Ile Leu Gly	
585 590 595	
tct cct ttc ttc cct tac ttt gcc aac cag gat tcc tat gct gct gcg	1878
Ser Pro Phe Phe Pro Tyr Phe Ala Asn Gln Asp Ser Tyr Ala Ala Ala	
600 605 610	
gtg agg agg acc cag act ccg gtg aag tac cag cag att aca cca agc	1926
Val Arg Arg Thr Gln Thr Pro Val Lys Tyr Gln Gln Ile Thr Pro Ser	
615 620 625 630	
atc aac cct tcc cgg agc tcc tcc ccc acg cag tat ggg ctg tcc aga	1974
Ile Asn Pro Ser Arg Ser Ser Ser Pro Thr Gln Tyr Gly Leu Ser Arg	
635 640 645	
aac ttc tcc tcc ctg aac ctc agc tcc agg gac agc ggc ttc tcc agc	2022
Asn Phe Ser Ser Leu Asn Leu Ser Ser Arg Asp Ser Gly Phe Ser Ser	
650 655 660	
ctc aat gac agc tcc tcc gag agg ggc cgc tac tca gac cga agc aga	2070
Leu Asn Asp Ser Ser Ser Glu Arg Gly Arg Tyr Ser Asp Arg Ser Arg	
665 670 675	
aac aag tac tac cgt ggt agt gtg tcc ctc aat tct tcc ccg aaa gga	2118
Asn Lys Tyr Tyr Arg Gly Ser Val Ser Leu Asn Ser Ser Pro Lys Gly	

```

680          685          690
aga tat ggt ggg aaa agt cag cat tcc aca cct tca aga gaa aga tat 2166
Arg Tyr Gly Gly Lys Ser Gln His Ser Thr Pro Ser Arg Glu Arg Tyr
695          700          705          710
tct gga aag ttc tac agg ctg ccc cag tca gcg ctg aac act cat cag 2214
Ser Gly Lys Phe Tyr Arg Leu Pro Gln Ser Ala Leu Asn Thr His Gln
          715          720          725
tcc cct gac ttc aag agg agc cca aat gac cat gac cgc cgt gtg ccc 2262
Ser Pro Asp Phe Lys Arg Ser Pro Asn Asp His Asp Arg Arg Val Pro
          730          735          740
agg acc ata ccc ggg atg cct ctg cac cct gag act gcc tcc aaa gca 2310
Arg Thr Ile Pro Gly Met Pro Leu His Pro Glu Thr Ala Ser Lys Ala
          745          750          755
ggg gaa gag gag agc agg gtg agc gaa ggg ggc tgg act aaa gtg gaa 2358
Gly Glu Glu Glu Ser Arg Val Ser Glu Gly Gly Trp Thr Lys Val Glu
          760          765          770
tat cgg aag aag aca cac agg caa ctt tgg gcc aag act agc aag gag 2406
Tyr Arg Lys Lys Thr His Arg Gln Leu Ser Ala Lys Thr Ser Lys Glu
775          780          785          790
aga acc cgt ggc aac tac cgt ggg cgg cgg aat ttt tga gggattgggt 2455
Arg Thr Arg Gly Asn Tyr Arg Gly Arg Arg Asn Phe
          795          800
cagatgcgct ttccaagcg ggtagtagt gctttgtgca atggattttt ggtaataagg 2515
tatcttgagg ttataggac caaaaaaga ctagtcttgg gcttgggaaa caccttttaa 2575
ctgaaaggac aaccaaagca ggcctcaat tatggctgtt agtcagtcaa ctagaggtgg 2635
caattaaact tgacaataac tgccaatgtt ttgtccctg aattactatt gaggtgggga 2695
gggctatgac attgcctgct gggaacattc gacaggctt ggggccagga taaagctagt 2755
gagaaccgca gaaaaatcat atttctggac aaaacaggat tcattctatc tctctttcat 2815
ctaagtcca agatggctct gcaaagcaat gtggacgatt cttgagttaa aatttgtttt 2875
ttgattttgg ggttttgtt tttttttta acctactggg ataaaatc atttatcttg 2935
attgctgagg gattttttta aatgcctcc cttaatgttg tgcccaagc aagtgcctca 2995
ctcattcca ctgtgtcagt atttatttta gtgagatatt tgtgtttct gccatgtca 3055
gtattgaact gatttgctt gtcattttta ggtaataaaa aaaagatta ttgaagttaa 3115
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 3146

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1429

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (37)..(1401)

&lt;400&gt; 4

```

cgattttgtg gacgtttact actttgtcat tatgag atg tgg tct ctc gga gcc 54
                                Met Ser Ser Leu Gly Ala
                                1              5
tcc ttt gtg caa att aag ttc gac gac ttg cag ttt ttt gaa aac tgc 102
Ser Phe Val Gln Ile Lys Phe Asp Asp Leu Gln Phe Phe Glu Asn Cys
          10          15          20
ggt gga gga agt ttt ggg agt gtg tat cga gcc aaa tgg ata tca cag 150

```

Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Gly	Ser	Val	Tyr	Arg	Ala	Lys	Trp	Ile	Ser	Gln	
		25					30					35				
gac	aag	gag	gtg	gct	gta	aag	aag	tta	ctc	aaa	ata	gag	aaa	gag	gca	198
Asp	Lys	Glu	Val	Ala	Val	Lys	Lys	Leu	Leu	Lys	Ile	Glu	Lys	Glu	Ala	
		40					45					50				
gaa	atc	ctg	agc	gtc	ctc	agt	cac	aga	aac	atc	atc	cag	ttt	tat	gga	246
Glu	Ile	Leu	Ser	Val	Leu	Ser	His	Arg	Asn	Ile	Ile	Gln	Phe	Tyr	Gly	
		55					60					65			70	
gtg	att	ctg	gaa	cct	ccc	aac	tat	ggc	atc	gtc	aca	gaa	tat	gct	tcc	294
Val	Ile	Leu	Glu	Pro	Pro	Asn	Tyr	Gly	Ile	Val	Thr	Glu	Tyr	Ala	Ser	
							75					80			85	
ctg	ggc	tcc	ctg	tat	gat	tac	att	aac	agc	aac	agg	agt	gaa	gag	atg	342
Leu	Gly	Ser	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Ile	Asn	Ser	Asn	Arg	Ser	Glu	Glu	Met	
							90					95			100	
gac	atg	gaa	cac	atc	atg	acc	tgg	gcc	act	gac	gta	gcc	aaa	ggg	atg	390
Asp	Met	Glu	His	Ile	Met	Thr	Trp	Ala	Thr	Asp	Val	Ala	Lys	Gly	Met	
							105					110			115	
cat	tac	tta	cac	atg	gaa	gct	cct	gtc	aag	gtg	atc	cac	aga	gac	ctc	438
His	Tyr	Leu	His	Met	Glu	Ala	Pro	Val	Lys	Val	Ile	His	Arg	Asp	Leu	
							120					125			130	
aag	tca	aga	aac	gtt	gtt	atc	gct	gct	gac	gga	gtg	ctg	aag	atc	tgt	486
Lys	Ser	Arg	Asn	Val	Val	Ile	Ala	Ala	Asp	Gly	Val	Leu	Lys	Ile	Cys	
							135					140			145	
gac	ttc	ggt	gcc	tcg	cgg	ttc	cat	aac	cac	aca	aca	cac	atg	tcc	ttg	534
Asp	Phe	Gly	Ala	Ser	Arg	Phe	His	Asn	His	Thr	Thr	His	Met	Ser	Leu	
							155					160			165	
gtt	gga	act	ttc	cca	tgg	atg	gct	cca	gaa	gtt	atc	cag	agt	ctc	cct	582
Val	Gly	Thr	Phe	Pro	Trp	Met	Ala	Pro	Glu	Val	Ile	Gln	Ser	Leu	Pro	
							170					175			180	
gtg	tct	gaa	acc	tgt	gac	acg	tat	tcc	tat	ggt	gtg	gtt	ctc	tgg	gag	630
Val	Ser	Glu	Thr	Cys	Asp	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Val	Val	Leu	Trp	Glu	
							185					190			195	
atg	cta	aca	agg	gag	gtc	ccc	ttt	aaa	ggt	ttg	gaa	gga	tta	caa	gta	678
Met	Leu	Thr	Arg	Glu	Val	Pro	Phe	Lys	Gly	Leu	Glu	Gly	Leu	Gln	Val	
							200					205			210	
gct	tgg	ctt	gta	gtg	gaa	aaa	aac	gag	aga	tta	acc	att	cca	agc	agc	726
Ala	Trp	Leu	Val	Val	Glu	Lys	Asn	Glu	Arg	Leu	Thr	Ile	Pro	Ser	Ser	
							215					220			225	
tgc	ccc	aga	agc	ttt	gct	gaa	ctg	cta	cac	cag	tgt	tgg	gag	gct	gat	774
Cys	Pro	Arg	Ser	Phe	Ala	Glu	Leu	Leu	His	Gln	Cys	Trp	Glu	Ala	Asp	
							235					240			245	
gcc	aag	aaa	cgg	cca	tcg	ttc	aag	caa	atc	att	tca	atc	ctg	gag	tct	822
Ala	Lys	Lys	Arg	Pro	Ser	Phe	Lys	Gln	Ile	Ile	Ser	Ile	Leu	Glu	Ser	
							250					255			260	
atg	tca	aat	gac	acg	aac	ctt	cct	gac	cag	tgt	aac	tca	ttt	tta	cac	870
Met	Ser	Asn	Asp	Thr	Asn	Leu	Pro	Asp	Gln	Cys	Asn	Ser	Phe	Leu	His	
							265					270			275	
aac	aag	gcg	gag	tgg	agg	tgt	gaa	att	gag	gca	acc	ctt	gag	cga	ctg	918
Asn	Lys	Ala	Glu	Trp	Arg	Cys	Glu	Ile	Glu	Ala	Thr	Leu	Glu	Arg	Leu	
							280					285			290	

```

aag aaa cta gag cga gat ctc agc ttt aaa gag cag gag ctc aaa gaa 966
Lys Lys Leu Glu Arg Asp Leu Ser Phe Lys Glu Gln Glu Leu Lys Glu
295          300          305          310
cgg gag aga cgt ctc aag atg tgg gag cag aag ctg acg gag caa tcc 1014
Arg Glu Arg Arg Leu Lys Met Trp Glu Gln Lys Leu Thr Glu Gln Ser
          315          320          325
aac acc ccg ctt ctc ttg cct ctc tct gca aga atg tct gag gag tct 1062
Asn Thr Pro Leu Leu Leu Pro Leu Ser Ala Arg Met Ser Glu Glu Ser
          330          335          340
tac ttt gaa tct aaa aca gag gag tca aac agt gca gag atg tca tgc 1110
Tyr Phe Glu Ser Lys Thr Glu Glu Ser Asn Ser Ala Glu Met Ser Cys
          345          350          355
cag atc act gca gca agt aac ggg gag ggc cat ggc atg aac cca ggc 1158
Gln Ile Thr Ala Ala Ser Asn Gly Glu Gly His Gly Met Asn Pro Gly
          360          365          370
ctg cag gcc atg atg ctc atg ggc ttt ggg gat gtc ttc tca atg aac 1206
Leu Gln Ala Met Met Leu Met Gly Phe Gly Asp Val Phe Ser Met Asn
          375          380          385          390
aaa gca gga gct gtg ctg cat tct ggg atg cag ata aac atg caa gcc 1254
Lys Ala Gly Ala Val Leu His Ser Gly Met Gln Ile Asn Met Gln Ala
          395          400          405
aag cag aat tca tcc aaa acc aca tgt aag agg aga ggg aag aaa gtc 1302
Lys Gln Asn Ser Ser Lys Thr Thr Cys Lys Arg Arg Gly Lys Lys Val
          410          415          420
aac atg gcc ctg ggg ttc agt gac ttt gac ctg tca gaa ggt gac gat 1350
Asn Met Ala Leu Gly Phe Ser Asp Phe Asp Leu Ser Glu Gly Asp Asp
          425          430          435
gat gac cat gat ggt gac gat gct gag aat gat gtg gat aat agt gaa 1398
Asp Asp His Asp Gly Asp Asp Ala Glu Asn Asp Val Asp Asn Ser Glu
          440          445          450
tga caccagaaag gaaaaaaaaa aaaaaaaa 1429
455
<210> 5
<211> 800
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5
Met Ser Ser Leu Gly Ala Ser Phe Val Gln Ile Lys Phe Asp Asp Leu
  1          5          10          15
Gln Phe Phe Glu Asn Cys Gly Gly Gly Ser Phe Gly Ser Val Tyr Arg
          20          25          30
Ala Lys Trp Ile Ser Gln Asp Lys Glu Val Ala Val Lys Lys Leu Leu
          35          40          45
Lys Ile Glu Lys Glu Ala Glu Ile Leu Ser Val Leu Ser His Arg Asn
          50          55          60
Ile Ile Gln Phe Tyr Gly Val Ile Leu Glu Pro Pro Asn Tyr Gly Ile
          65          70          75          80
Val Thr Glu Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Tyr Asp Tyr Ile Asn Ser
          85          90          95
Asn Arg Ser Glu Glu Met Asp Met Asp His Ile Met Thr Trp Ala Thr

```

100	105	110
Asp Val Ala Lys Gly Met His Tyr Leu His Met Glu Ala Pro Val Lys		
115	120	125
Val Ile His Arg Asp Leu Lys Ser Arg Asn Val Val Ile Ala Ala Asp		
130	135	140
Gly Val Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Ala Ser Arg Phe His Asn His		
145	150	155
Thr Thr His Met Ser Leu Val Gly Thr Phe Pro Trp Met Ala Pro Glu		
165	170	175
Val Ile Gln Ser Leu Pro Val Ser Glu Thr Cys Asp Thr Tyr Ser Tyr		
180	185	190
Gly Val Val Leu Trp Glu Met Leu Thr Arg Glu Val Pro Phe Lys Gly		
195	200	205
Leu Glu Gly Leu Gln Val Ala Trp Leu Val Val Glu Lys Asn Glu Arg		
210	215	220
Leu Thr Ile Pro Ser Ser Cys Pro Arg Ser Phe Ala Glu Leu Leu His		
225	230	235
Gln Cys Trp Glu Ala Asp Ala Lys Lys Arg Pro Ser Phe Lys Gln Ile		
245	250	255
Ile Ser Ile Leu Glu Ser Met Ser Asn Asp Thr Ser Leu Pro Asp Lys		
260	265	270
Cys Asn Ser Phe Leu His Asn Lys Ala Glu Trp Arg Cys Glu Ile Glu		
275	280	285
Ala Thr Leu Glu Arg Leu Lys Lys Leu Glu Arg Asp Leu Ser Phe Lys		
290	295	300
Glu Gln Glu Leu Lys Glu Arg Glu Arg Arg Leu Lys Met Trp Glu Gln		
305	310	315
Lys Leu Thr Glu Gln Ser Asn Thr Pro Leu Leu Pro Ser Phe Glu Ile		
325	330	335
Gly Ala Trp Thr Glu Asp Asp Val Tyr Xaa Trp Val Gln Gln Leu Val		
340	345	350
Arg Lys Gly Asp Ser Ser Ala Glu Met Ser Val Tyr Ala Ser Leu Phe		
355	360	365
Lys Glu Asn Asn Ile Thr Gly Lys Arg Leu Leu Leu Leu Glu Glu Glu		
370	375	380
Asp Leu Lys Asp Met Gly Ile Val Ser Lys Gly His Ile Ile His Phe		
385	390	395
Lys Ser Ala Ile Glu Lys Leu Thr His Asp Tyr Ile Asn Leu Phe His		
405	410	415
Phe Pro Pro Leu Ile Lys Asp Ser Gly Gly Glu Pro Glu Glu Asn Glu		
420	425	430
Glu Lys Ile Val Asn Leu Glu Leu Val Phe Gly Phe His Leu Lys Pro		
435	440	445
Gly Thr Gly Pro Gln Asp Cys Lys Trp Lys Met Tyr Met Glu Met Asp		
450	455	460
Gly Asp Glu Ile Ala Ile Thr Tyr Ile Lys Asp Val Thr Phe Asn Thr		
465	470	475
Asn Leu Pro Asp Ala Glu Ile Leu Lys Met Thr Lys Pro Pro Phe Val		
485	490	495
Met Glu Lys Trp Ile Val Gly Ile Ala Lys Ser Gln Thr Val Glu Cys		

500 505 510  
 Thr Val Thr Tyr Glu Ser Asp Val Arg Thr Pro Lys Ser Thr Lys His  
 515 520 525  
 Val His Leu Ile Gln Trp Ser Arg Thr Lys Pro Gln Asp Glu Val Lys  
 530 535 540  
 Ala Val Gln Leu Ala Ile Gln Thr Leu Phe Thr Asn Ser Asp Gly Asn  
 545 550 555 560  
 Pro Gly Ser Arg Ser Asp Ser Ser Ala Asp Cys Gln Trp Leu Asp Thr  
 565 570 575  
 Leu Arg Met Arg Gln Ile Ala Ser Asn Thr Ser Leu Gln Arg Ser Gln  
 580 585 590  
 Ser Asn Pro Ile Leu Gly Ser Pro Phe Phe Ser His Phe Asp Gly Gln  
 595 600 605  
 Asp Ser Tyr Ala Ala Ala Val Arg Arg Pro Gln Val Pro Ile Lys Tyr  
 610 615 620  
 Gln Gln Ile Thr Pro Val Asn Gln Ser Arg Ser Ser Ser Pro Thr Gln  
 625 630 635 640  
 Tyr Gly Leu Thr Lys Asn Phe Ser Ser Leu His Leu Asn Ser Arg Asp  
 645 650 655  
 Ser Gly Phe Ser Ser Gly Asn Thr Asp Thr Ser Ser Glu Arg Gly Arg  
 660 665 670  
 Tyr Ser Asp Arg Ser Arg Asn Lys Tyr Gly Arg Gly Ser Ile Ser Leu  
 675 680 685  
 Asn Ser Ser Pro Arg Gly Arg Tyr Ser Gly Lys Ser Gln His Ser Thr  
 690 695 700  
 Pro Ser Arg Gly Arg Tyr Pro Gly Lys Phe Tyr Arg Val Ser Gln Ser  
 705 710 715 720  
 Ala Leu Asn Pro His Gln Ser Pro Asp Phe Lys Arg Ser Pro Arg Asp  
 725 730 735  
 Leu His Gln Pro Asn Thr Ile Pro Gly Met Pro Leu His Pro Glu Thr  
 740 745 750  
 Asp Ser Arg Ala Ser Glu Glu Asp Ser Lys Val Ser Glu Gly Gly Trp  
 755 760 765  
 Thr Lys Val Glu Tyr Arg Lys Lys Pro His Arg Pro Ser Pro Ala Lys  
 770 775 780  
 Thr Asn Lys Glu Arg Ala Arg Gly Asp His Arg Gly Trp Arg Asn Phe  
 785 790 795 800  
 <210> 6  
 <211> 455  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6  
 Met Ser Ser Leu Gly Ala Ser Phe Val Gln Ile Lys Phe Asp Asp Leu  
 1 5 10 15  
 Gln Phe Phe Glu Asn Cys Gly Gly Gly Ser Phe Gly Ser Val Tyr Arg  
 20 25 30  
 Ala Lys Trp Ile Ser Gln Asp Lys Glu Val Ala Val Lys Lys Leu Leu  
 35 40 45  
 Lys Ile Glu Lys Glu Ala Glu Ile Leu Ser Val Leu Ser His Arg Asn  
 50 55 60



Ile Ile Gln Phe Tyr Gly Val Ile Leu Glu Pro Pro Asn Tyr Gly Ile  
 65 70 75 80  
 Val Thr Glu Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Tyr Asp Tyr Ile Asn Ser  
 85 90 95  
 Asn Arg Ser Glu Glu Met Asp Met Asp His Ile Met Thr Trp Ala Thr  
 100 105 110  
 Asp Val Ala Lys Gly Met His Tyr Leu His Met Glu Ala Pro Val Lys  
 115 120 125  
 Val Ile His Arg Asp Leu Lys Ser Arg Asn Val Val Ile Ala Ala Asp  
 130 135 140  
 Gly Val Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Ala Ser Arg Phe His Asn His  
 145 150 155 160  
 Thr Thr His Met Ser Leu Val Gly Thr Phe Pro Trp Met Ala Pro Glu  
 165 170 175  
 Val Ile Gln Ser Leu Pro Val Ser Glu Thr Cys Asp Thr Tyr Ser Tyr  
 180 185 190  
 Gly Val Val Leu Trp Glu Met Leu Thr Arg Glu Val Pro Phe Lys Gly  
 195 200 205  
 Leu Glu Gly Leu Gln Val Ala Trp Leu Val Val Glu Lys Asn Glu Arg  
 210 215 220  
 Leu Thr Ile Pro Ser Ser Cys Pro Arg Ser Phe Ala Glu Leu Leu His  
 225 230 235 240  
 Gln Cys Trp Glu Ala Asp Ala Lys Lys Arg Pro Ser Phe Lys Gln Ile  
 245 250 255  
 Ile Ser Ile Leu Glu Ser Met Ser Asn Asp Thr Ser Leu Pro Asp Lys  
 260 265 270  
 Cys Asn Ser Phe Leu His Asn Lys Ala Glu Trp Arg Cys Glu Ile Glu  
 275 280 285  
 Ala Thr Leu Glu Arg Leu Lys Lys Leu Glu Arg Asp Leu Ser Phe Lys  
 290 295 300  
 Glu Gln Glu Leu Lys Glu Arg Glu Arg Arg Leu Lys Met Trp Glu Gln  
 305 310 315 320  
 Lys Leu Thr Glu Gln Ser Asn Thr Pro Leu Leu Leu Pro Leu Ala Ala  
 325 330 335  
 Arg Met Ser Glu Glu Ser Tyr Phe Glu Ser Lys Thr Glu Glu Ser Asn  
 340 345 350  
 Ser Ala Glu Met Ser Cys Gln Ile Thr Ala Thr Ser Asn Gly Glu Gly  
 355 360 365  
 His Gly Met Asn Pro Ser Leu Gln Ala Met Met Leu Met Gly Phe Gly  
 370 375 380  
 Asp Ile Phe Ser Met Asn Lys Ala Gly Ala Val Met His Ser Gly Met  
 385 390 395 400  
 Gln Ile Asn Met Gln Ala Lys Gln Asn Ser Ser Lys Thr Thr Ser Lys  
 405 410 415  
 Arg Arg Gly Lys Lys Val Asn Met Ala Leu Gly Phe Ser Asp Phe Asp  
 420 425 430  
 Leu Ser Glu Gly Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Gly Glu Glu Glu Asp  
 435 440 445  
 Asn Asp Met Asp Asn Ser Glu  
 450 455

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 802

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 7

```

Met Ser Ser Leu Gly Ala Ser Phe Val Gln Ile Lys Phe Asp Asp Leu
  1             5             10             15
Gln Phe Phe Glu Asn Cys Gly Gly Gly Ser Phe Gly Ser Val Tyr Arg
      20             25             30
Ala Lys Trp Ile Ser Gln Asp Lys Glu Val Ala Val Lys Lys Leu Leu
      35             40             45
Lys Ile Glu Lys Glu Ala Glu Ile Leu Ser Val Leu Ser His Arg Asn
      50             55             60
Ile Ile Gln Phe Tyr Gly Val Ile Leu Glu Pro Pro Asn Tyr Gly Ile
      65             70             75             80
Val Thr Glu Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Tyr Asp Tyr Ile Asn Ser
      85             90             95
Asn Arg Ser Glu Glu Met Asp Met Glu His Ile Met Thr Trp Ala Thr
      100            105            110
Asp Val Ala Lys Gly Met His Tyr Leu His Met Glu Ala Pro Val Lys
      115            120            125
Val Ile His Arg Asp Leu Lys Ser Arg Asn Val Val Ile Ala Ala Asp
      130            135            140
Gly Val Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Ala Ser Arg Phe His Asn His
      145            150            155            160
Thr Thr His Met Ser Leu Val Gly Thr Phe Pro Trp Met Ala Pro Glu
      165            170            175
Val Ile Gln Ser Leu Pro Val Ser Glu Thr Cys Asp Thr Tyr Ser Tyr
      180            185            190
Gly Val Val Leu Trp Glu Met Leu Thr Arg Glu Val Pro Phe Lys Gly
      195            200            205
Leu Glu Gly Leu Gln Val Ala Trp Leu Val Val Glu Lys Asn Glu Arg
      210            215            220
Leu Thr Ile Pro Ser Ser Cys Pro Arg Ser Phe Ala Glu Leu Leu His
      225            230            235            240
Gln Cys Trp Glu Ala Asp Ala Lys Lys Arg Pro Ser Phe Lys Gln Ile
      245            250            255
Ile Ser Ile Leu Glu Ser Met Ser Asn Asp Thr Asn Leu Pro Asp Gln
      260            265            270
Cys Asn Ser Phe Leu His Asn Lys Ala Glu Trp Arg Cys Glu Ile Glu
      275            280            285
Ala Thr Leu Glu Arg Leu Lys Lys Leu Glu Arg Asp Leu Ser Phe Lys
      290            295            300
Glu Gln Glu Leu Lys Glu Arg Glu Arg Arg Leu Lys Met Trp Glu Gln
      305            310            315            320
Lys Leu Thr Glu Gln Ser Asn Thr Pro Leu Leu Pro Ser Phe Glu Ile
      325            330            335
Gly Ala Trp Thr Glu Asp Asp Val Tyr Phe Trp Val Gln Gln Leu Val
      340            345            350
Arg Lys Gly Glu Ser Ser Val Glu Met Ser Gly Tyr Ala Ser Leu Phe

```

355	360	365
Lys Glu Asn Asn Ile Thr	Gly Lys Arg Leu Leu Leu	Leu Glu Glu Glu
370	375	380
Asp Leu Lys Asp Met Gly	Ile Val Ser Lys Gly	His Ile Ile His Phe
385	390	395
Lys Ser Ala Ile Glu Lys	Leu Thr His Asp Tyr	Leu Asn Leu Phe His
405	410	415
Phe Pro Pro Leu Ile Lys	Asp Ser Gly Gly Glu	Pro Glu Glu Asn Glu
420	425	430
Glu Lys Ile Val Asn Leu	Glu Leu Val Phe Gly	Phe His Leu Lys Pro
435	440	445
Gly Thr Gly Pro Gln Asp	Cys Lys Trp Lys Met	Tyr Met Glu Met Asp
450	455	460
Gly Asp Glu Val Ala Ile	Thr Tyr Ile Lys Asp	Val Thr Phe Asn Thr
465	470	475
Ser Leu Pro Asp Ala Glu	Ile Leu Lys Met Thr	Lys Pro Pro Phe Val
485	490	495
Met Glu Lys Trp Ile Val	Gly Ile Ala Glu Asp	Gln Thr Val Glu Cys
500	505	510
Thr Val Thr Tyr Glu Asn	Asp Val Arg Thr Pro	Lys Leu Thr Lys His
515	520	525
Val His Ser Ile Gln Trp	Asp Arg Thr Lys Pro	Gln Asp Glu Val Lys
530	535	540
Ala Val Gln Leu Ala Ile	Gln Thr Leu Phe Ser	Ser Ser Glu Gly Asn
545	550	555
Pro Gly Ser Arg Ser Asp	Ser Ser Ala Asp Cys	Gln Trp Leu Asp Thr
565	570	575
Leu Arg Met Arg Gln Ile	Ala Ser His Thr Ser	Leu Gln Arg Ser Gln
580	585	590
Ser Asn Pro Ile Leu Gly	Ser Pro Phe Phe Pro	Tyr Phe Ala Asn Gln
595	600	605
Asp Ser Tyr Ala Ala Ala	Val Arg Arg Thr Gln	Thr Pro Val Lys Tyr
610	615	620
Gln Gln Ile Thr Pro Ser	Ile Asn Pro Ser Arg	Ser Ser Ser Pro Thr
625	630	635
Gln Tyr Gly Leu Ser Arg	Asn Phe Ser Ser Leu	Asn Leu Ser Ser Arg
645	650	655
Asp Ser Gly Phe Ser Ser	Leu Asn Asp Ser Ser	Ser Glu Arg Gly Arg
660	665	670
Tyr Ser Asp Arg Ser Arg	Asn Lys Tyr Tyr Arg	Gly Ser Val Ser Leu
675	680	685
Asn Ser Ser Pro Lys Gly	Arg Tyr Gly Gly Lys	Ser Gln His Ser Thr
690	695	700
Pro Ser Arg Glu Arg Tyr	Ser Gly Lys Phe Tyr	Arg Leu Pro Gln Ser
705	710	715
Ala Leu Asn Thr His Gln	Ser Pro Asp Phe Lys	Arg Ser Pro Asn Asp
725	730	735
His Asp Arg Arg Val Pro	Arg Thr Ile Pro Gly	Met Pro Leu His Pro
740	745	750
Glu Thr Ala Ser Lys Ala	Gly Glu Glu Glu Ser	Arg Val Ser Glu Gly

755                      760                      765  
 Gly Trp Thr Lys Val Glu Tyr Arg Lys Lys Thr His Arg Gln Leu Ser  
 770                      775                      780  
 Ala Lys Thr Ser Lys Glu Arg Thr Arg Gly Asn Tyr Arg Gly Arg Arg  
 785                      790                      795                      800  
 Asn Phe  
 <210> 8  
 <211> 454  
 <212> PRT  
 <213> Mouse  
 <400> 8  
 Met Ser Ser Leu Gly Ala Ser Phe Val Gln Ile Lys Phe Asp Asp Leu  
 1                      5                      10                      15  
 Gln Phe Phe Glu Asn Cys Gly Gly Gly Ser Phe Gly Ser Val Tyr Arg  
 20                      25                      30  
 Ala Lys Trp Ile Ser Gln Asp Lys Glu Val Ala Val Lys Lys Leu Leu  
 35                      40                      45  
 Lys Ile Glu Lys Glu Ala Glu Ile Leu Ser Val Leu Ser His Arg Asn  
 50                      55                      60  
 Ile Ile Gln Phe Tyr Gly Val Ile Leu Glu Pro Pro Asn Tyr Gly Ile  
 65                      70                      75                      80  
 Val Thr Glu Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Leu Tyr Asp Tyr Ile Asn Ser  
 85                      90                      95  
 Asn Arg Ser Glu Glu Met Asp Met Glu His Ile Met Thr Trp Ala Thr  
 100                      105                      110  
 Asp Val Ala Lys Gly Met His Tyr Leu His Met Glu Ala Pro Val Lys  
 115                      120                      125  
 Val Ile His Arg Asp Leu Lys Ser Arg Asn Val Val Ile Ala Ala Asp  
 130                      135                      140  
 Gly Val Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Ala Ser Arg Phe His Asn His  
 145                      150                      155                      160  
 Thr Thr His Met Ser Leu Val Gly Thr Phe Pro Trp Met Ala Pro Glu  
 165                      170                      175  
 Val Ile Gln Ser Leu Pro Val Ser Glu Thr Cys Asp Thr Tyr Ser Tyr  
 180                      185                      190  
 Gly Val Val Leu Trp Glu Met Leu Thr Arg Glu Val Pro Phe Lys Gly  
 195                      200                      205  
 Leu Glu Gly Leu Gln Val Ala Trp Leu Val Val Glu Lys Asn Glu Arg  
 210                      215                      220  
 Leu Thr Ile Pro Ser Ser Cys Pro Arg Ser Phe Ala Glu Leu Leu His  
 225                      230                      235                      240  
 Gln Cys Trp Glu Ala Asp Ala Lys Lys Arg Pro Ser Phe Lys Gln Ile  
 245                      250                      255  
 Ile Ser Ile Leu Glu Ser Met Ser Asn Asp Thr Asn Leu Pro Asp Gln  
 260                      265                      270  
 Cys Asn Ser Phe Leu His Asn Lys Ala Glu Trp Arg Cys Glu Ile Glu  
 275                      280                      285  
 Ala Thr Leu Glu Arg Leu Lys Lys Leu Glu Arg Asp Leu Ser Phe Lys  
 290                      295                      300  
 Glu Gln Glu Leu Lys Glu Arg Glu Arg Arg Leu Lys Met Trp Glu Gln

305                      310                      315                      320  
 Lys Leu Thr Glu Gln Ser Asn Thr Pro Leu Leu Leu Pro Leu Ser Ala  
                                  325                      330                      335  
 Arg Met Ser Glu Glu Ser Tyr Phe Glu Ser Lys Thr Glu Glu Ser Asn  
                                  340                      345                      350  
 Ser Ala Glu Met Ser Cys Gln Ile Thr Ala Ala Ser Asn Gly Glu Gly  
                                  355                      360                      365  
 His Gly Met Asn Pro Gly Leu Gln Ala Met Met Leu Met Gly Phe Gly  
                                  370                      375                      380  
 Asp Val Phe Ser Met Asn Lys Ala Gly Ala Val Leu His Ser Gly Met  
 385                                   390                                   395                                   400  
 Gln Ile Asn Met Gln Ala Lys Gln Asn Ser Ser Lys Thr Thr Cys Lys  
                                  405                                   410                                   415  
 Arg Arg Gly Lys Lys Val Asn Met Ala Leu Gly Phe Ser Asp Phe Asp  
                                  420                                   425                                   430  
 Leu Ser Glu Gly Asp Asp Asp Asp His Asp Gly Asp Asp Ala Glu Asn  
                                  435                                   440                                   445  
 Asp Val Asp Asn Ser Glu  
                                  450

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	(参考)
C 0 7 K	16/40	C 1 2 Q	1/02
C 1 2 Q	1/02		1/68
	1/68		A
G 0 1 N	33/15	G 0 1 N	33/15
	33/50		33/50
	33/53		33/53
			D
			M
			33/573
	33/573	C 1 2 N	15/00
			Z N A A

(72)発明者 泰地 陸夫  
 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98  
 号 住友製薬株式会社内

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BA13 BB20 CB01  
 DA12 DA13 DA14 DA20 DA36  
 DA77 FB01 FB02 FB03  
 4B024 AA11 CA04 CA09 CA11 CA12  
 CA20 DA02 FA10 GA11 GA18  
 HA12  
 4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ03  
 QQ08 QQ13 QQ20 QQ27 QQ42  
 QQ52 QR56 QR62 QR66 QR77  
 QR80 QS16 QS24 QS36 QX02  
 4C084 AA13 AA17 BA35 CA18 NA14  
 ZC33 ZC35  
 4H045 AA11 BA10 DA75 EA50